

Untersuchungen zur Genregulation durch Discoidin-Domain-Rezeptoren und deren Bedeutung in der Brustdrüsenentwicklung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

**von Elena Faraci-Orf
aus Offenbach**

Frankfurt im Oktober 2003
(DF1)

Vom Fachbereich 14 (chemische und pharmazeutische Wissenschaften) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) dient in mehrzelligen Organismen nicht nur als mechanische Stütze, sondern nimmt direkten Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Migration. Die Discoidin-Domain-Rezeptoren (DDR) 1 und 2 sind die bisher einzig bekannten ECM-bindenden Rezeptoren mit einer intrinsischen Kinaseaktivität. Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Sie nehmen durch Bindung spezifischer Liganden Signale außerhalb der Zelle auf und initiieren eine Signalkaskade, die letztlich zur Transkription oder Repression von Zielgenen führt. Nach Bindung von nativem Kollagen an die Rezeptoren DDR1 und DDR2 kommt es zu einer Homodimerisierung, die zur Autophosphorylierung der Rezeptoren führt. Eine generierte DDR1-Knock-out-Maus zeigt einen Defekt in der Differenzierung der Brustdrüse und ist nicht in der Lage, ihre Jungen zu säugen, die genauen Ursachen hierfür sind jedoch bislang unbekannt. Ebenso sind die Zielgene der aktivierten Rezeptoren und insbesondere die Rolle von DDR1 in der Brustdrüse bislang wenig erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Zielgenen, die durch die Signalkaskade von DDR1 und DDR2 in ihrer Transkription beeinflusst werden, gesucht. Außerdem wurde die Rolle von DDR1 in der Brustdrüse im Detail analysiert. Zur Auffindung von Zielgenen wurden Zelllinien generiert, in denen die Expression von DDR durch Doxycyclin reprimierbar ist und mit Hilfe von Microarrays auf die Deregulation von Matrixgenen sowie Matrix-assoziierten und -modifizierenden Genen untersucht. Agrin und $\alpha 3$ -Integrin konnten als gemeinsame, reprimierte Zielgene von DDR1 und 2 identifiziert werden. Der P-Selectin-Ligand PSGL-1 und das Proteoglykan Decorin wurden von beiden Rezeptoren induziert.

Weiterhin wurde das Brustdrüsengewebe trächtiger DDR1-Knock-out-Mäuse mit dem Brustdrüsengewebe heterozygoter Mäuse verglichen. Dazu wurden Microarrays verwendet, auf denen 15.000 Gene abgebildet waren. Die Analyse zeigte eine Repression von MDGI (Mammary derived growth inhibitor), Osteopontin und WDNMI in DDR1-Knock-out-Mäusen, während die Transkription des IGF-Bindeprotein IGFBP-5 erhöht war. Die Deregulationen konnten mittels Real-time-PCR verifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von DDR1 in der nicht-transformierten Brustepithelzelllinie HC11 und in primären Brustepithelzellen aus DDR1-Knock-out Mäusen untersucht. Dabei konnte ein Defekt von DDR1-Knock-out Zellen in der terminalen Differenzierung beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu differenzierten DDR1 überexprimierende HC11-Zellen schneller als HC11-Wildtyp-Zellen und bildeten größere Mengen des Differenzierungsmarkers β -Kasein. Die Analyse verschiedener Signalwege, die bei der Differenzierung von Brustepithelzellen angeschaltet werden, zeigte, dass DDR1 eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion von Stat5a/b spielt. Die Prolaktin induzierte Stat5a/b-Phosphorylierung war in DDR1 exprimierenden HC11 Zellen stärker und länger anhaltend als in parentalen HC11 Zellen. Dieser Effekt konnte nach Aktivierung von DDR1 durch Typ I Kollagen noch verstärkt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten PSGL-1, Decorin, Agrin und Integrin α 3 als Zielgene in DDR1 und DDR2 überexprimierenden Zellen identifiziert werden. Ferner wurde im Brustdrüsengewebe von DDR1-Knock-out-Mäusen eine Repression von MDGI, Osteopontin und WDNMI sowie eine Induktion von IGFBP-5 gefunden.

Die Analyse DDR1 überexprimierender HC11 Zellen und primärer DDR1-Knock-out-Brustepithelzellen zeigte, dass DDR1 eine essentielle Rolle in der terminalen Differenzierung von Brustepithelzellen hat. Dabei konnte erstmals ein Einfluss von DDR1 auf die Prolaktin-induzierte Aktivierung von Stat5a/b gezeigt werden.

1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung der Brustdrüse.....	1
1.1.1 Embryogenese/Geburt.....	1
1.1.2 Pubertät.....	2
1.1.3 Schwangerschaft.....	2
1.1.4 Laktation.....	2
1.1.5 Rückbildung der Brustdrüse (Involution).....	3
1.2 Signaltransduktion in der Brustdrüse.....	5
1.3 Die Bedeutung der extrazellulären Matrix.....	7
1.3.1 Die Bedeutung der ECM in der Brustdrüse	9
1.4 Funktion und Bedeutung von Rezeptor-Tyrosinkinasen	10
1.5 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen DDR1 und DDR2	12
1.5.1 Die Expression von DDRs	14
1.5.2 Kollagene als Signaltransduktionsmoleküle	15
1.5.3 Signaltransduktion von DDR1	17
1.5.4 Signaltransduktion von DDR2.....	18
1.5.5 Die Rolle von DDR1 in der Brustdrüsenentwicklung	19
1.5.6 Phänotyp der DDR1-Knock-out-Mäuse	19
1.5.7 Phänotyp der DDR2-Knock-out-Mäuse	20
1.5.8 Die Rolle der DDRs bei Krebs	21
1.6 Microarrays.....	21
1.6.1 Allgemeine Einführung	21
1.6.2 Anwendungsgebiete für Microarrays	23
1.6.3 Benutzung von Microarrays bei der Analyse differenzieller Genexpression	24
1.7 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Plasmide	25
2.2 E.coli-Stämme und Anzuchtbedingungen.....	25
2.3 Zelllinien und Medien.....	25
2.4 Antikörper	26
2.5 Primer für die Real-time-PCR	27
2.6 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	27
2.7 Molekularbiologische Methoden	28
2.7.1 Enzymatische Behandlung von DNA.....	28
2.7.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	28
2.7.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten	28

2.7.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gel-Elektrophorese	28
2.7.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	29
2.7.4 Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	29
2.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	30
2.7.5.1 Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)	30
2.7.5.2 Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)	30
2.7.5.3 Photometrische Bestimmung der DNA/RNA Konzentration	30
2.8 RNA-Aufreinigung und Analytik	31
2.8.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA	31
2.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA	31
2.8.3 Isolierung von mRNA	32
2.9 Real-time-PCR	32
2.9.1 Umschreiben von RNA in cDNA	32
2.9.2 Primerdesign für Real-time-Experimente	33
2.9.3 Durchführung der Real-time-Experimente	33
2.9.4 Auswertung der Real-time-PCR	35
2.10 Microarray-Analytik	36
2.10.1 ECM-spezifische Arrays	36
2.10.1.1 Auswertung der ECM-Arrays	37
2.10.2 OCI Arrays	37
2.10.2.1 Auswertung der Arrays	38
2.11 Zellbiologische Methoden	39
2.11.1 Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen	39
2.11.2 Subkultivierung von adhärenenten Säugerzellen	40
2.11.3 Transfektion von Säugerzellen	40
2.11.3.1 Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitation	40
2.11.3.2 Lipofectamin	41
2.11.3.3 Retrovirale Transduktion von Säugerzellen	41
2.11.4 Lysieren von Säugerzellen	42
2.11.5 Luciferase- und β -Galaktosidase-Test	42
2.11.6 Proliferationsassay	43
2.11.7 Adhäsionsassay	43
2.11.8 Beschichten von Zellkulturschalen mit Kollagen	43
2.11.9 Differenzierungsassay in 2D	44

2.11.10 Differenzierungsassay im Kollagen-Gel	44
2.11.11 Isolierung von primären Brustepithelzellen	45
2.11.11.1 Herstellung eines Percoll™-Gradienten	46
2.12 Proteinbiochemische Methoden	46
2.12.1 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	46
2.12.2 SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese	46
2.12.3 Elektrottransfer	47
2.12.3.1 Ponceau-Färbung der Nitrocellulose-Membran	47
2.12.4 Immunchemischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)	47
2.12.5 Entfernen von an der Membran gebundenen Antikörpern („Strippen“)	48
2.12.6 Immunpräzipitation (IP)	48
3 Ergebnisse	50
3.1 Identifizierung der Zielgene von DDR1 und DDR2	50
3.1.1 Design des Microarray-Experiments	50
3.1.1.1 Auswahl einer geeigneten Kontrolle	51
3.1.2 Generierung von Zelllinien mit reprimierbarer DDR-Expression ..	52
3.1.3 Kinetik der Repression	55
3.1.4 Differenzielle Genexpression in Doxycyclin behandelten Zellen ..	56
3.1.5 Clusteranalyse der in HT1080 deregulierten Gene	62
3.2 Analyse der Genexpression in der Brustdrüse der DDR1-	
Knock-out-Maus	63
3.2.1 Design des Microarray-Experiments	63
3.2.2 Differenziell regulierte Gene in der Brustdrüse der DDR1-	
Knock-out-Maus	64
3.2.3 Real-time-Experimente zur Bestätigung der putativen Zielgene von DDR1	66
3.3 Analyse der Rolle von DDR1 in nicht-transformierten Brustepithelzellen	69
3.3.1 DDR1-Rezeptorstatus in HC11-Zellen	69
3.3.2 Infektion von HC11-Zellen mit DDR1	71
3.4 Vergleichende Charakterisierung von HC11- und HC11DDR1-	
Zellen	72
3.4.1 Verhalten von HC11-/HC11DDR1-Zellen in 3D-Kollagen-	
Kulturen	72
3.4.2 Proliferation von HC11-/HC11DDR1-Zellen im Kollagen-Gel	74
3.4.3 Proliferation von HC11-/HC11DDR1-Zellen	75
3.4.4 Proliferation auf Kollagen beschichteten Zellkulturschalen	76

3.4.5	Adhäsion von HC11-/HC11DDR1-Zellen auf unbehandelten Zellkulturschalen.....	77
3.4.6	Adhäsion von HC11-/HC11DDR1-Zellen auf Kollagen beschichteten Zellkulturschalen	78
3.4.7	Differenzierung von HC11-/HC11DDR1-Zellen	79
3.4.7.1	Nachweis der Expression von β -Kasein auf Proteinebene.....	79
3.4.7.2	Nachweis der Expression von β -Kasein auf RNA-Ebene.....	81
3.4.8	Signaltransduktionskaskade zur Differenzierung von Brustepithelzellen	82
3.4.8.1	Glucocorticoid-Rezeptor-Signalkaskade	82
3.4.8.2	Insulin-Rezeptor Signaltransduktion.....	84
3.4.8.3	Stat5a/b-Signalkaskade.....	85
3.4.8.3.1	<i>Kinetik der DIP induzierten Stat5a/b- Phosphorylierung</i>	<i>87</i>
3.4.8.3.2	<i>Kollagenabhängigkeit der Stat5a/b- Phosphorylierung</i>	<i>88</i>
3.5	Charakterisierung von primären Epithelzellen aus Brustdrüsengewebe von heterozygoten und Knock-out-Mäusen..	89
3.5.1	Expression von DDR1.....	90
3.5.2	Verhalten in 3D-Kollagen-Kulturen	91
4	Diskussion.....	94
4.1	Zielgene von DDR1 und 2 in induzierbaren Zellsystemen	94
4.1.1	Reprimierbare DDR-Expression in Zelllinien	94
4.1.2	Überprüfung der induzierbaren DDR-Expression.....	95
4.1.3	Deregulierte Gene in DDR überexprimierenden HT1080- und NIH3T3-Zellen	95
4.1.3.1	In DDR überexprimierenden Zelllinien ist die Transkription von Agrin reprimiert	97
4.1.3.2	Matrix degradierende Proteine	98
4.1.3.3	Integrine	99
4.1.3.4	PGS2 (Decorin)	99
4.1.3.5	PSGL-1	99
4.1.3.6	BMP (Bone morphogenic protein)	100
4.2	Analyse der Genexpression in der Brustdrüse schwangerer DDR1-Knock-out-Mäuse	101
4.2.1	Auswertung der Microarray-Daten.....	102

4.2.2	Microarray-Daten können mit der Real-time-PCR verifiziert werden	103
4.2.3	DDR1 regulierte Zielgene und ihre Bedeutung in der Brustdrüse	103
4.2.3.1	MDGI (mammary derived growth inhibitor)	104
4.2.3.2	Osteopontin (OPN)	105
4.2.3.3	Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5)	105
4.2.3.4	Weitere Beobachtungen	106
4.2.3.5	Ausblick I	107
4.3	In-vitro-Studien über die Bedeutung von DDR1 in Brustepithelzellen	108
4.3.1	Charakterisierung und Transfektion von HC11-Zellen	108
4.3.2	DDR1 beeinflusst die Adhäsion von HC11-Zellen auf Kollagen	109
4.3.3	Überexpression von DDR1 verhindert bei HC11-Zellen im 3D-Kollagen-Gel die morphologische Differenzierung	110
4.3.4	Die Proliferation von HC11-Zellen wird durch DDR1 nicht beeinflusst	112
4.3.5	Die Expression des Differenzierungsmarkers β -Kasein ist in HC11DDR1-Zellen stark erhöht	112
4.3.6	Untersuchung der Signalkaskaden, die zur Expression von β -Kasein führen	114
4.3.6.1	DDR1 hat keinen Einfluss auf die Glucocorticoid-Signalkaskade	114
4.3.6.2	DDR1 hat keinen Einfluss auf die Insulin induzierte Signalkaskade	116
4.3.6.3	DDR1 verstärkt die Prolaktin induzierte Phosphorylierung von Stat5a/b	117
4.3.6.4	Aktivierung von DDR1 verstärkt den Effekt von DDR1 auf die Stat5a/b-Phosphorylierung	119
4.3.6.5	Der β -Kasein-Promotor wird durch verschiedene ECM abhängige Transkriptionsfaktoren reguliert	120
4.3.6.6	Wie könnte DDR1 die Phosphorylierung von Stat5 beeinflussen?	121
4.3.7	Ausblick II	122
5	Literatur	124
6	Abkürzungsverzeichnis	138
7	Anhang	141
	Danksagungen, Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Die Entwicklung der Brustdrüse

Die Brustdrüse ist für viele Entwicklungsbiologen ein ideales Untersuchungsobjekt, da sie als einziges Organ den größten Teil ihrer Entwicklung erst nach der Geburt durchläuft (Medina, 1996). Außerdem kann sie im Laufe eines Lebens bedingt durch Schwangerschaft mehrere Zyklen der Differenzierung und Rückbildung durchlaufen. Im Folgenden werden die verschiedenen Entwicklungsstadien der Brustdrüse beschrieben.

1.1.1 Embryogenese/Geburt

Im Maus-Embryo beginnt die Entwicklung der Brustdrüse bereits am Tag 10-11 nach der Befruchtung (embryonaler Tag E10-E11). Zu diesem Zeitpunkt stellen die Brustdrüsen lediglich einen Strang kugelartiger Verdickungen des Ektoderms dar (fünf an jeder Seite) (Sakakura, 1987). Bis zum Tag E13 haben durch Proliferation der Zellen die Knospungen an Größe zugenommen und die Migration derselben führt zu einer Ansammlung von epithelialen Zellen in der Epidermis. Weitere Zellen wandern von der benachbarten Epidermis ein und bilden eine Verbindung zwischen der Epidermis und der Knospung. Bis zur Geburt am Tag E21 führt weitere Proliferation der Zellen zu einigen wenigen, verzweigten Gängen (ihre Zahl liegt bei 15-20). Sie gehen von einem Hauptgang aus, welcher mit der Brustwarze verbunden ist (Sakakura, 1987).

Das Mesenchym, bestehend aus konzentrisch angeordneten Lagen von Fibroblasten, umgibt die epithelialen Ausknospungen vom Tag E14 an. Ab dem Tag E16 beginnen die Präadipozyten, die den späteren Fettgewebeskörper bilden („mammary fat pad“), sich zu vermehren. Dieses Fettgewebe ist für die spätere Differenzierung der Epithelzellen von außerordentlicher Wichtigkeit.

Zum Zeitpunkt der Geburt stellt sich die Brustdrüse als Fettgewebeskörper dar, in den einige wenige, kurze Stränge hineinragen (siehe Abbildung 1.1). Sie sind über einen Hauptstrang mit der Brustwarze verbunden. Ihre Enden sind verdickt und weisen eine erhöhte Proliferation auf. Dies ist auf den Einfluss der plazentagängigen, mütterlichen Hormone zurückzuführen. Die Verdickung der Enden sowie die von ihnen ausgehende Proliferation endet mit Wegfall der mütterlichen Hormone einige Tage nach der Geburt wieder.

In den ersten drei Lebenswochen verläuft das Wachstum der Brustdrüse relativ zum Gesamtwachstum der Maus. Es finden keine wesentlichen Veränderungen statt.

1.1.2 Pubertät

Bis zum Eintritt der Pubertät wächst die Brustdrüse lediglich im Verhältnis zum Gesamtorganismus. Mit Beginn der Geschlechtsreife erhöht sich unter dem Einfluss der ovarialen Hormone Östrogen und Progesteron, die Proliferationsrate der Brustdrüse erheblich. Die Enden der rudimentären Gänge verdicken sich und bilden die „terminal end buds“ (TEB). Von dort aus wachsen die Milchgänge in das umgebende Fettgewebe ein und verzweigen sich (Abbildung 1.1). Dabei scheinen sowohl systemische Hormone als auch lokale Faktoren eine Rolle zu spielen, denn das Wachstum eines Ganges stoppt, wenn der Kanal die Grenzen des Fettgewebeskörper erreicht hat oder den kritischen Abstand zu einem anderen Milchgang unterschreitet (Topper & Freeman, 1980).

1.1.3 Schwangerschaft

Erst beim Auftreten einer Schwangerschaft erhält die Brustdrüse ihre Funktion. Durch das Zusammenspiel zahlreicher Hormone (hauptsächlich Prolaktin und Progesteron) findet während der Schwangerschaft ein massives Wachstum des Brustdrüsengewebes statt (Korach, 1994). Die Milchgänge wachsen und verzweigen sich, bis sie schließlich den ganzen Fettgewebeskörper ausfüllen (siehe Abbildung 1.1). Außerdem kommt es zu einer Differenzierung der Zellen in sogenannte Alveolen. Das sind traubenartige (lobuläre) Strukturen an den Enden der verzweigten Gänge, welche nach der Geburt für die Expression und Sekretion der Milchproteine, Milchlipide und Milchzucker verantwortlich sind.

1.1.4 Laktation

Während der Laktation ist der gesamte Fettgewebeskörper der Brustdrüse von den funktionell differenzierten Alveolen ausgefüllt, die die Milchproteine exprimieren (siehe Abbildung 1.1). Nach Geburt der Jungen kommt es zu zahlreichen Veränderungen im Hormonhaushalt, die zum Teil für die Laktation von großer Bedeutung sind: der Progesteronspiegel fällt ab, der Östrogenspiegel steigt. Damit verbunden wird die Ausschüttung von Prolaktin und dem Wachstumshormon Somatotropin (= „growth hormone“) im Hypophysenvorderlappen angeregt. Ebenso steigt der Glucocorticoidspiegel.

Das Zusammenspiel dieser Hormone sorgt für die anhaltende Milchproduktion. Außerdem wird durch das Säugen der Jungen die ständige Prolaktin-Expression gewährleistet. Zum Ende der Stillzeit oder bei frühzeitiger Wegnahme des Wurfes, bildet sich die differenzierte Brustdrüse fast vollständig wieder zurück.

Für die optimale Expression von Milchproteinen von epithelialen Brustzellen *in-vitro* wird Insulin, Prolaktin und Glucocorticoid benötigt (Hennighausen *et al.*, 1997).

1.1.5 Rückbildung der Brustdrüse (Involution)

Mit dem Wegfall des Prolaktins und der anderen laktogenen Hormone kommt es in der Brustdrüse zu massivem, programmiertem Zelltod (Apoptose). Die Drüsenläppchen bilden sich zurück, so dass die Brustdrüse den Phänotyp wiedererlangt, den sie vor Einsetzen der Schwangerschaft hatte.

Die Rückbildung der Brustdrüse kann durch drei Ereignisse ausgelöst werden (Neville *et al.*, 2002):

1. Die synthetisierte Milch wird nicht (mehr) aus der Brustdrüse entfernt.
2. Die für die Laktation wichtigen Hormone fallen weg.
3. Die Milchproduktion geht zurück.

Ist die Rückbildung der Brustdrüse in Gang gesetzt - im natürlichen Fall durch Beendigung des Säugens und damit verbunden eine Anhäufung von Milch in den Alveolen - wird der Vorgang der Involution ohne weiteren Hormoneinfluss fortgesetzt.

Kennzeichnend für die Involution ist der Anstieg in der Expression Matrix degradierender Enzyme wie den Matrix-Metalloproteasen (MMP) (Werb *et al.*, 1996 und Z. Werb in <http://mammary.nih.gov/reviews>). Drei Tage nach Beendigung des Säugens kommt es zu einem Anstieg in der Expression von MMP3, MMP2, MMP11, MMP13, tPA und uPA (tissue-type und urokinase-type plasminogen activator) (Talhouk *et al.*, 1992; Witty *et al.*, 1995). Diese Proteasen werden hauptsächlich von Fibroblasten exprimiert, die sich um die Milchgänge herum befinden, sowie Stroma-Zellen, die die Alveolen umgeben (Lund *et al.*, 1996). Während dieser degenerativen Phase der Involution ist also erneut die Interaktion zwischen mesenchymalen und epithelialen Zellen von großer Bedeutung.

Die Expression dieser Proteasen sowie die gleichzeitige Herunterregulation von TIMPs (tissue inhibitor of metallo-proteinases) sorgen für die Degradation der Basalmembran, wodurch die Epithelzellen den Kontakt zur Matrix verlieren (Wiesen & Werb, 2000).

Der Abbau der Basalmembran durch Matrix degradierende Enzyme hat für die Epithelzellen Konsequenzen. Ihre Fähigkeit, β -Kasein zu exprimieren, geht damit zurück und der Verlust der Zell-Matrix-Kontakte aktiviert Signale, die in den Zellen Apoptose auslösen (Li *et al.*, 1997). Die alveolären Strukturen der Drüsenläppchen fallen zusammen, die sekretorischen Epithelzellen, die Endothelzellen und die Myoepithelzellen werden durch programmierten Zelltod entfernt und durch Adipozyten ersetzt.

Dieser Ablauf von Differenzierung, Laktation und Involution wird bei jeder Schwangerschaft von neuem durchlaufen.

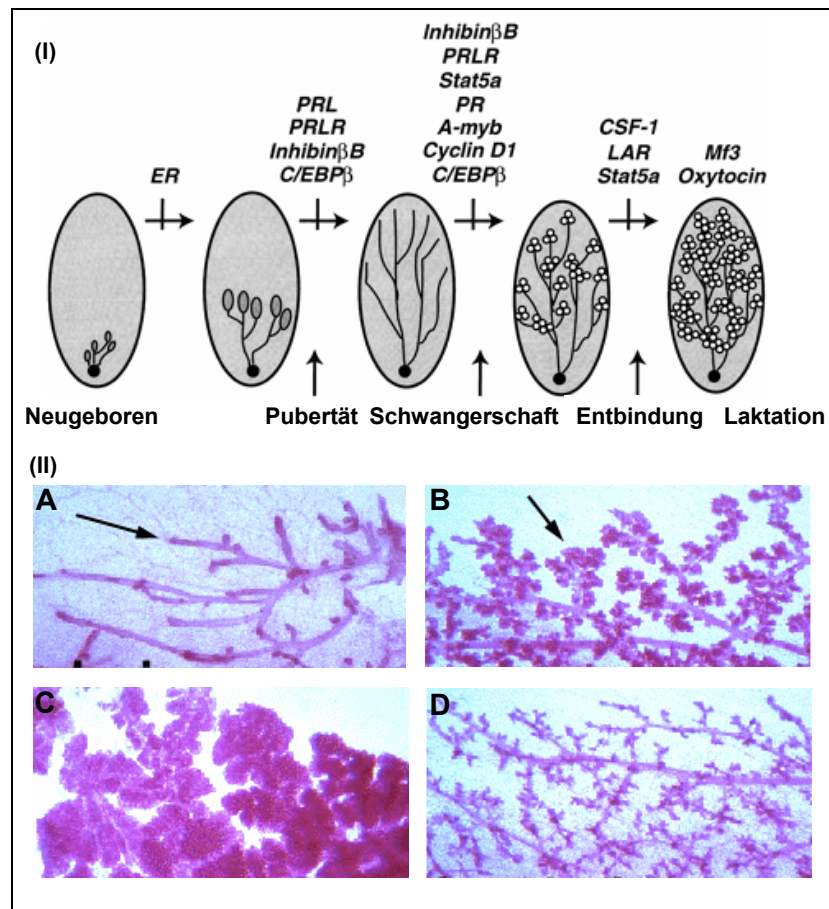


Abbildung 1.1 Überblick über die verschiedenen Stadien der Brustdrüsen-Entwicklung.

(I): Schematische Darstellung mit Angaben der Faktoren, die bei dem jeweiligen Stadium eine Rolle spielen (modifiziert nach Hennighausen & Robinson, 1998). Abkürzungen: ER: Östrogen, PRL: Prolaktin, PRLR: Prolaktin-Rezeptor, Stat5: signal transducers and activators of transcription, PR: Progesteron, CSF-1: Makrophagen-spezifischer koloniestimulierender Faktor-1, LAR: Leukozyten-Antigen-Rezeptor.

(II): Hämatoxylin-Eosin gefärbte Organpräparate der Maus-Brustdrüse (aus <http://mammary.nih.gov> Hennighausen). **A:** Unreife Brustdrüse vor einer Schwangerschaft, die verdickten Enden sind deutlich zu sehen (Pfeil). **B:** Schwangerschaft (Tag E16), Ausbildung der Alveolen (Pfeil) beginnt. **C:** Laktation, die Brustdrüse ist mit Alveolen ausgefüllt. **D:** Involution.

1.2 Signaltransduktion in der Brustdrüse

Die Differenzierung der Brustdrüse ist wie oben geschildert ein Vorgang, bei dem massive Veränderungen des Gewebes stattfinden. Dieser Wechsel von der ruhenden zur laktierenden Brustdrüse bedarf eines fein abgestimmten Wechselspiels verschiedenster Signale.

Eine herausragende Funktion hat hierbei das Prolaktin (Riddle, 1933). Prolaktin ist ein 23 kDa großes Peptid, das in der Hypophyse wie auch in der Brustdrüse selbst synthetisiert wird (Clevenger & Plank, 1997). Es spielt bei zahlreichen Organen und Geweben eine Rolle, wie zum Beispiel bei der Regulation der Gonaden (Kelly *et al.*, 1991), im Immunsystem (Gala, 1991) sowie bei der Vorbereitung und Stimulation der Brustdrüse auf die Laktation (Hennighausen, 1997). In der späteren Schwangerschaft (E14) steigt die Expression von Prolaktin sprunghaft an (Liu *et al.*, 1996) und bleibt bis zum Ende der Laktationsperiode auf hohem Niveau. Dies lässt den Schluss zu, dass Prolaktin eine unverzichtbare Komponente bei der terminalen Differenzierung der Brustdrüse ist.

Prolaktin bindet mit hoher Affinität an den Prolaktin-Rezeptor (PRLR). Dieser besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne und gehört zu der Familie der Zytokin-Rezeptoren (Boutin *et al.*, 1988). Es sind zwei Isoformen des Prolaktin-Rezeptors bekannt, die durch alternatives Splicing entstehen (Hu *et al.*, 2001), allerdings scheint nur die längere Form in Differenzierungsprozessen eine Rolle zu spielen (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

Prolaktin kann eine Reihe von Signalmolekülen aktivieren (Goffin *et al.*, 2002). In-vivo-Studien haben allerdings gezeigt, dass der Jak2/Stat5-Signalweg, der hauptsächlich genutzt ist (siehe Abbildung 1.2) (Liu *et al.*, 1997). Nach Bindung des Prolaktins an den Prolaktin-Rezeptor kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors, welche dazu führt, dass die assoziierte Janus-Kinase-2 (Jak2) aktiviert wird. Aktiviertes Jak2 phosphoryliert daraufhin den Prolaktin-Rezeptor wie auch sich selbst. Der phosphorylierte Prolaktin-Rezeptor stellt eine Bindungsstelle für Stat-Moleküle („signal transducers and activators of transcription“) dar, welche in inaktiver Form im Zytoplasma vorliegen. Vier der insgesamt sieben Stats (Stat1, 3, 5a und 5b) sind in der Lage, mit dem Prolaktin-Rezeptor zu interagieren (Freeman *et al.*, 2000). Stat5a und b spielen im Zusammenhang mit dem Prolaktin-Rezeptor allerdings die Hauptrolle (Schmitt-Ney *et al.*, 1991). Die beiden stat5-Gene (stat5a und 5b) sind in der Maus zu 96 % identisch. Es wird daher angenommen, dass sie durch Genduplikation entstanden sind (Liu *et al.*, 1995).

Die Stat5-Moleküle werden zum phosphorylierten Rezeptor rekrutiert und kommen somit in die Nähe des aktivierten Jak2. Das kinase-aktive Jak2 kann anschließend Stat5 an C-terminalen Tyrosinresten phosphorylieren. Aktiviertes Stat5 dimerisiert durch die gegenseitige Interaktion der SH2-(Src-homologe) Domäne mit dem phosphorylierten Tyrosinrest und wandert in den Zellkern. Im Zellkern können die Stat5-Dimere als Transkriptionsfaktoren fungieren und zusammen mit anderen Faktoren (z. B. Koaktivatoren) die Expression von Genen beeinflussen, welche eine GAS- (γ -Interferon activation site) Sequenz in ihrem Promotor haben. Die Konsensus-Sequenz eines GAS-Elements ist TTCNNGAA, wobei N eine beliebige Base sein kann (Schmitt-Ney *et al.*, 1991). Gene, die solche GAS-Elemente in ihren Promotoren haben, sind z. B. Milchproteine wie WAP (whey acidic protein), β -Lactalbumin und β -Kasein (Andres *et al.*, 1987; Pittius *et al.*, 1988).

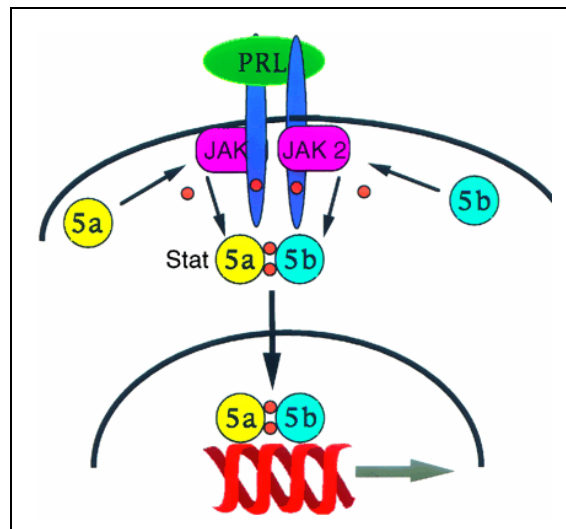


Abbildung 1.2 Prolaktin/JAK2/Stat-Signalweg (nach Hennighausen, 1997). Nach Bindung von Prolaktin an den Prolaktin-Rezeptor dimerisiert der Rezeptor. Dadurch wird die assoziierte Janus-Kinase aktiviert. Diese phosphoryliert den Rezeptor, sich selbst sowie Stat5a und Stat5b. Phosphoryliertes Stat5 dimerisiert (Bildung von Homo- und Heterodimeren) und wandert in den Zellkern, wo es die Transkription von Genen, welche ein GAS-Element besitzen, bewirken kann. PRL: Prolaktin, JAK2: Janus-Kinase-2, Stat5: signal transducers and activators of transcription, GAS: γ -Interferon activation site.

Allerdings ist aktiviertes Stat5 nicht ausreichend, um eine β -Kasein-Transkription zu bewirken. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass man durch die kombinierte Zugabe von Prolaktin, Insulin und Dexamethason eine optimale Aktivierung der β -Kasein-Transkription erreichen kann (Hennighausen, 1997).

Stat5a und Stat5b sind in fast allen Geweben exprimiert und können in der Zellkultur durch Prolaktin, Wachstumsfaktor, EGF und zahlreiche Zytokine aktiviert werden.

Bei Prolaktin-Rezeptor (Ormandy *et al.*, 1997a; Ormandy *et al.*, 1997b) wie auch Bei Stat5a-Knock-out-Mäusen (Liu *et al.*, 1997) ist die Proliferation der Alveolen und die funktionelle Differenzierung derselben gestört, wodurch die Mäuse nicht in der Lage sind, zu lactieren.

Das Stat5-Protein setzt sich aus mehreren Domänen zusammen, die unterschiedliche Funktionen haben (Abbildung 1.3). Die „coiled coil“-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen, die DNA-Bindedomäne erkennt und bindet GAS-Stellen in Promotoren von Zielgenen, die SH2-Domäne ist für die Interaktion mit dem Rezeptor sowie die Dimerisierung verantwortlich, während die Transaktivierungsdomäne die Transkription von Zielgenen vermittelt.

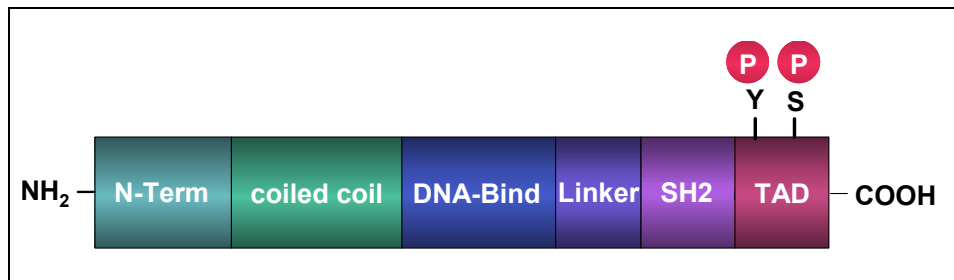


Abbildung 1.3 Struktur der Stats (modifiziert nach O'Shea *et al.*, 2002) N-terminale Domäne, „coiled-coil“-Domäne, DNA-Bindedomäne, Linker, SH2-Domäne und Transaktivierungsdomäne mit phosphorylierten Tyrosin- und Serinresten sind gezeigt.

1.3 Die Bedeutung der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist definiert als eine komplexe Mischung von Proteinen, Proteoglykanen und Glykoproteinen, welche den Zellen bzw. dem Gewebe eine strukturelle und mechanische Stütze bietet (Pupa *et al.*, 2002). Aber die ECM dient nicht nur als passive Stütze, sie reguliert auch eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration, Adhäsion, Genexpression und Differenzierung (Prince *et al.*, 2002). Sie ist als eine Erweiterung der Zellen zu sehen, da sie aktiv an der Regulation der Zellfunktionen teilnimmt. Die ECM ist eine informative Einheit, die strukturelle wie auch funktionelle Signale erhält, vermittelt und integriert (Bissell, 1986). Die Bedeutung der ECM darf auch in der Zellkultur nicht unterschätzt werden. Experimente auf normalen Zellkulturplatten spiegeln die tatsächliche In-vivo-Situation nur schlecht wider und so setzt sich immer mehr die Erkenntnis durch, dass Zellkultur-Experimente in der 3D-Kultur (Kollagen oder Matrigel) die besseren Modelle darstellen (Abbott, 2003).

Jeder Zelltyp exprimiert Rezeptoren, die mit der ECM direkt oder aber mit Matrix assoziierten Proteinen interagieren, welche die Gestalt einer Zelle oder ihr Verhalten beeinflussen können. Die ECM hat (z. B. über die Expression von IGF-Bindeproteinen) einen großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von sekretierten Hormonen und Wachstumsfaktoren (Woodward *et al.*, 2000). Außerdem kann das Vorhandensein von extrazellulärer Matrix in-vitro die Expression von IGF-Rezeptoren erhöhen, was ebenfalls Einfluss auf die Intensität der Signale hat.

Eine besondere Rolle spielt die extrazelluläre Matrix bei der Krebsentstehung und -entwicklung. Normalerweise sorgt eine Basalmembran, - eine hoch spezialisierte ECM - dafür, dass Zellen nicht aus dem Gewebeverband entfliehen können. Ein Kriterium für maligne Transformation stellt die Invasion dar. Dabei lösen sich Zellen aus dem Zellverband und gelangen durch die Basalmembran in andere Gewebe (Abbildung 1.4). Um dies zu erreichen, müssen die Zellen die ECM verändern. Das kann zum Beispiel durch MMP induzierten Abbau geschehen. In der Tat sind zahlreiche MMPs mit maligner Transformation assoziiert (Edwards *et al.*, 2003; Susskind, 2003).

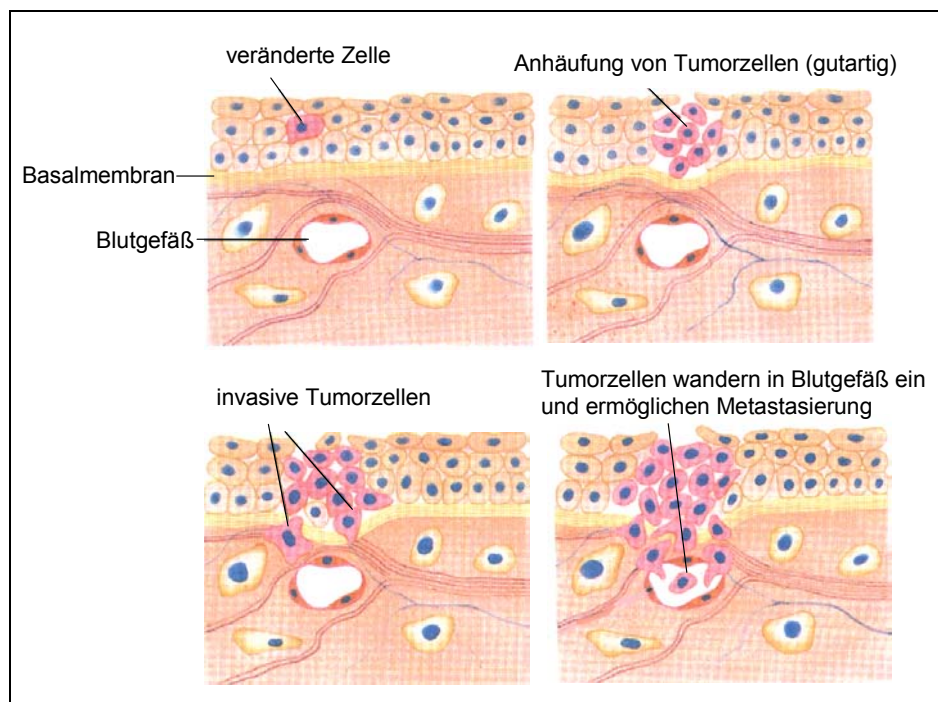


Abbildung 1.4 Stadien des Tumorwachstums und der Metastasierung (modifiziert nach Lodish *et al.*, 1995).

Die bekanntesten Rezeptoren, die direkt mit Matrixproteinen interagieren, sind die Integrine. Über die Kombination verschiedener α/β -Dimere (=funktionelle Einheit) ergibt sich die Spezifität des jeweiligen Liganden. Integrine können je nach Dimer-Kombination z. B. Laminine, Fibronektine oder Kollagene binden. Integrine besitzen keine katalytische Aktivität und sind bei der Signalweiterleitung auf andere Proteine mit Kinase-Aktivität angewiesen. DDRs (Discoidin Domain Receptor) sind die bisher einzigen Matrix-Rezeptoren mit katalytischer Aktivität.

Die Signaltransduktionskaskade der Integrine nach der Ligandenbindung ist schon intensiv untersucht worden (Giancotti & Ruoslahti, 1999). Die Bindung von ECM-Molekülen an den spezifischen Integrin-Rezeptor führt zur Aktivierung der FAK (focal adhesion kinase). Über die Rekrutierung zahlreicher Adaptorproteine und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Fyn und Shc kann schließlich der Raf/Ras/MAPK- oder der JNK- (Jun-aminoterminal-Kinase) Signalweg angeschaltet werden (Turner, 2000). Auch im Zusammenhang mit Integrinen wird die außerordentlich wichtige Rolle der ECM bei der Signaltransduktion deutlich. Blockiert man in-vitro die Funktion von $\beta 1$ -Integrin in Krebszellen, die sich in einer dreidimensionalen Matrix befinden, so verlieren sie zahlreiche Charakteristika der Transformation. Dieses Phänomen ist nicht in der traditionellen, zweidimensionalen Zellkultur zu sehen (Weaver *et al.*, 1997), was den Einfluss der ECM unterstreicht, Signaltransduktion zu beeinflussen. Ebenso macht dieses Ergebnis deutlich, wie wichtig die 3D-Kultur bei der Untersuchung von biologischen Prozessen in der Zellkultur ist (Abbott, 2003).

1.3.1 Die Bedeutung der ECM in der Brustdrüse

Dass die ECM eine herausragende Rolle in der Brustdrüse spielt, ist schon seit langem bekannt (Gatmaitan *et al.*, 1983; Streuli, 1993). In Primärkulturen von Brustepithelzellen zeigte sich, dass diese nur differenzieren können, wenn sie auf bzw. in einer geeigneten Matrix wachsen (Edwards *et al.*, 1996; Roskelley *et al.*, 1995). Extrazelluläre Matrixproteine, die vom Brustepithel synthetisiert werden, sind z. B. Laminin, Proteoglykane und Kollagen IV. Mesenchymale Zellen in der Brustdrüse exprimieren weiterhin Fibronektin (Keely *et al.*, 1995; Sakakura, 1987). Sowohl Laminine als auch Kollagene sind - verbunden mit Prolaktin - für die Transkription von gewebespezifischen Milchgenen verantwortlich gemacht worden (Streuli *et al.*, 1991; Streuli & Bissell, 1991). Schon sehr früh konnte gezeigt werden, dass Komponenten der ECM Wachstumsfaktoren ersetzen oder ihre Wirkung beeinflussen können (Gatmaitan *et al.*, 1983).

In Experimenten, bei denen die Proteinexpression von Brustepithelzellen auf Plastik, auf mit Kollagen beschichteten Platten oder in dreidimensionalen Kollagen-Gelen miteinander verglichen wurde, konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Gestalt von Zellen und deren Fähigkeit, Milchproteine zu exprimieren, nachgewiesen werden. So scheint die Expression von Kaseinen nicht nur von Hormonen abhängig zu sein, sondern auch in hohem Maße vom umgebenden Substrat und damit verbunden der Gestalt einer Epithelzelle (Bissell, 1986a). Streuli *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von Milchproteinen wie das β -Laktoglobulin durch ECM-Moleküle induziert wird und diese Transkriptionsinduktion über Stat5 vermittelt wird (Streuli *et al.*, 1995). Es gibt eine große Anzahl von Publikationen, die sich mit der Interaktion zwischen Integrinen und der ECM und deren Bedeutung für Brustepithelzellen in-vivo und in-vitro beschäftigen (Faraldo *et al.*, 2000; Faraldo *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 1998; Woodward *et al.*, 2001). Allerdings fehlen nähere Untersuchungen, welche Signale von den Kollagen-Rezeptoren DDR1 und 2 ausgehen und wie sie Brustepithelzellen bzw. die Entwicklung der Brustdrüse beeinflussen können (Vogel *et al.*, 2001). Dass sie eine wichtige Rolle spielen, kann man aufgrund der fehlenden funktionellen Differenzierung der Brustdrüse in DDR1(-/-)-Mäusen schließen.

1.4 Funktion und Bedeutung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) sind eine Familie transmembraner Proteine, welche bei fundamentalen Prozessen wie Zellteilung, Differenzierung, Bewegung, Metabolismus und Überleben eine wichtige Rolle spielen (Schlessinger & Ullrich, 1992). RTKs sind daher als zentrale Signaltransduktionsmoleküle für alle mehrzelligen Organismen unersetzbar. Als Signaltransduktion werden im weitesten Sinne alle Signale verstanden, die das Verhalten oder die Funktion einer Zelle beeinflussen (Hunter, 2000). Die Sequenzierung des menschlichen Genoms zeigte, dass es mindestens 58 RTKs gibt (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Die Aktivität der Tyrosinkinasen unterliegt in der Zelle einer scharfen Kontrolle und Regulation. Eine Störung der Signalweiterleitung durch Mutationen oder andere genetische Veränderungen kann zu einer deregulierten Kinaseaktivität und damit zur malignen Transformation führen. Etwas mehr als die Hälfte aller bekannten RTKs (31) wurden wiederholt in mutierter oder überexprimierter Form in bösartig transformierten Zellen gefunden (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

RTKs sind aufgrund der Struktur ihrer extrazellulären Domäne in verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 1.5).

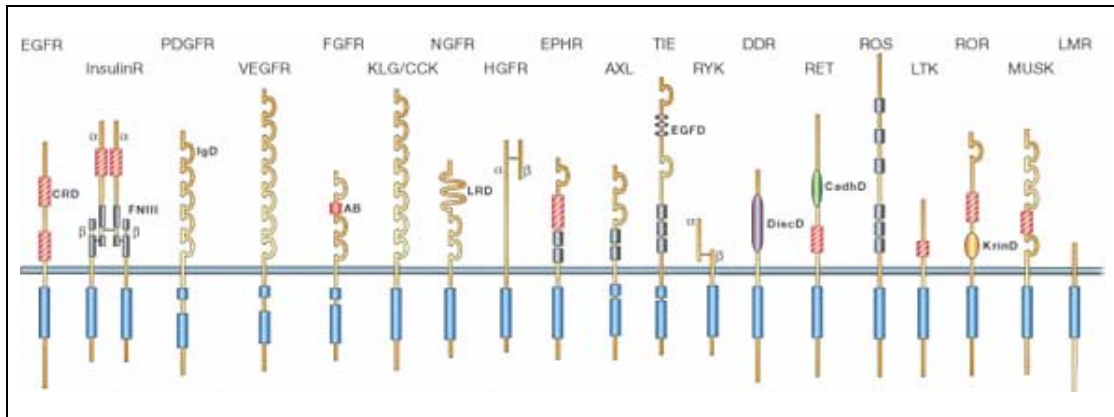


Abbildung 1.5 Rezeptor-Tyrosinkinase-Familien (nach Blume-Jensen & Hunter, 2001)

Abkürzungen: GFR: „Growth factor receptor“ Wachstumsfaktor-Rezeptor; EGFR: epidermaler GFR; PDGFR: „platelet derived“ Blutplättchen-stammender GFR; VEGFR: vasculärer endothelialer GFR; FGFR: Fibroblasten GFR; KLG/CCK: Kolon Karzinom Kinase; NGFR: Nerv-GFR; HGFR: Hepatozyten-GFR; EPHR: Ephrin-Rezeptor; AXL: aTyro3 Protein-Tyrosinkinase; TIE: RTK in endothelialen Zellen; RYK: Tyrosinkinasen verwandter Rezeptor; DDR: Discoidin-Domain-Rezeptor; RET: „rearranged during transfection“ umgeordnet während der Transfektion; ROS: in einigen epithelialen Zelltypen exprimierte RTK; LTK: Leukozyten-Tyrosinkinase; ROR: „receptor orphan“ Rezeptorweise; MUSK: Muskel-spezifische Kinase; LMR: Lemur. CRD: Cystein-reiche Domäne; FNIII: Fibronectin TypIII-artige Domäne; IgD: Immunglobulin-artige Domäne; AB: „acidic box“, saure Domäne; LRD: Leucin-reiche Domäne; EGFD: epidermaler Wachstumsfaktor-artige Domäne; DiscD: Discoidin-Domäne; CadhD: Cadherin-artige Domäne; KrimD: Kringel-artige Domäne.

RTKs werden durch die Bindung eines spezifischen Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert und leiten das Signal über definierte Signalwege schließlich zum Zellkern weiter (Pawson, 1995). Durch die Bindung des Liganden kommt es zu einer Oligomerisation (zumeist die Bildung von Dimeren) des Rezeptors, was zur Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität führt. Die durch Autophosphorylierung erzeugten, phosphorylierten Tyrosinreste ermöglichen dann die spezifische Bindung zytoplasmatischer Signalmoleküle mit SH2- (Src-homologe-Domäne) oder PTB-Domänen (Phosphotyrosin-Bindedomäne). Diese Signalmoleküle können selbst wieder Tyrosinkinasen sein, wie z. B. Src, Abl oder Fyn, oder aber Adaptormoleküle, z. B. Shc, Grb2 oder Nck (Hunter, 2000). Während zytoplasmatische Tyrosinkinasen weitere Proteine phosphorylieren, rekrutieren Adaptormoleküle andere Proteine zum aktivierten Rezeptor.

Für einige RTKs konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung des Rezeptors allein nicht ausreicht, um die Kinase zu aktivieren (Jiang & Hunter, 1999). Erst die durch Bindung des Liganden erzeugte Konformationsänderung des Rezeptors führt bei diesen RTKs zur vollständigen Aktivierung der Kinase.

Die Aktivierung eines Signalwegs führt letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche dann für die Transkription entsprechender Zielgene sorgen.

1.5 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen DDR1 und DDR2

Eine Untergruppe der RTKs stellen die Discoidin-Domain-Rezeptoren 1 und 2 dar. Sie sind durch die Discoidin-Domäne im extrazellulären Bereich der Rezeptoren charakterisiert. Die Discoidin-Domäne hat ihren Namen von Discoidin, einem Lektin, das zuerst im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* charakterisiert wurde. Dort spielt es eine Rolle beim Aggregationsprozess (Rosen *et al.*, 1973; Springer *et al.*, 1984).

Domänen, die homolog zum Discoidin sind, finden sich in zahlreichen anderen transmembranen und sekretierten Proteinen (Fuentes-Prior *et al.*, 2002), z. B. in Neuropilin (Soker *et al.*, 1998), Neurexin und den Blutgerinnungsfaktoren V und VIII (Kane & Davie, 1988). Die Discoidin-Domäne ist etwa 160 Aminosäuren lang und zwischen den einzelnen Proteinen konserviert. Neuropilin ist ein Rezeptor für Semaphorine, membranständige und sekretierte Glykoproteine. Es spielt wie Neurexin eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Der Discoidin-Domäne im Neuropilin folgt eine weitere etwa 80 Aminosäuren lange Sequenz, die eine hohe Homologie zur extrazellulären Domäne von DDR2 aufweist (Lai & Lemke, 1994). Neurexin ist für Zell-Zellkontakte verantwortlich. Es stellt im Nervensystem die Verbindung zwischen Neuronen und Gliazellen her.

Das Protein XLR-1 besteht fast ausschließlich aus einer Discoidin-Domäne. Mutationen im XLR-1-Gen führen zu der Erbkrankheit Retinoschisis, welche x-chromosomal vererbt wird und zu einer Degeneration der Augenretina führt (Sauer *et al.*, 1997). Doch die Funktion des Proteins ist bislang unklar (Fuentes-Prior *et al.*, 2002).

Discoidin-Domain-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Discoidin-Domäne, einer transmembranen Domäne, einer ungewöhnlich langen juxtamembran-Domäne und einer intrazellulären Kinasedomäne. Für einige RTKs wie z. B. dem PDGFR und EphR konnte gezeigt werden, dass die juxtamembran-Domäne für die Autoinhibition des Rezeptors verantwortlich ist (Binns *et al.*, 2000). Die in den Discoidin-Domain-Rezeptoren besonders lange juxtamembran-Domäne könnte eine ähnliche Funktion haben.

Es sind fünf natürlich vorkommende Isoformen von DDR1 bekannt (DDR1a-e, siehe Abbildung 1.6), welche durch alternatives Splicing entstehen (Alves *et al.*, 2001). DDR1b enthält zusätzlich das 11. Exon, welches für 37 Aminosäuren kodiert und DDR1c hat weitere sechs Aminosäuren vor der Kinasedomäne, welche in den anderen Isoformen fehlen. Den Isoformen DDR1d und DDR1e fehlt eine funktionierende Kinasedomäne. Im experimentellen Ansatz konnte ein Konstrukt, aus welchem die Kinasedomäne deletiert wurde (von Aminosäure 529 an), als dominant negativer Rezeptor die Phosphorylierung von DDR1a, b und c hemmen (Vogel *et al.*, 2000), doch mit den natürlich vorkommenden kinase-defizienten Isoformen DDR1d und 1e war dies nicht möglich (Alves *et al.*, 2001). Über das Expressionsmuster sowie mögliche, spezifische Funktionen der Isoformen ist nichts bekannt. Von DDR2 sind bisher keine Splicevarianten gefunden worden.

DDR1 befindet sich auf dem Chromosom 6, Abschnitt p21.3. DDR1b setzt sich aus 913 Aminosäuren zusammen und kann im Western Blot aufgrund von starker Glykosylierung mit einer Größe von 125 kDa detektiert werden. Es wird von einer noch unbekannten Protease in eine membran-gebundene 63 kDa und eine lösliche 54 kDa große Untereinheit gespalten (Alves *et al.*, 1995). DDR2 findet man auf dem Chromosom 1, Abschnitt q12-23. Es ist 885 Aminosäuren lang, ebenfalls stark glykosyliert und zeigt daher im Western Blot eine Größe von 130 kDa.

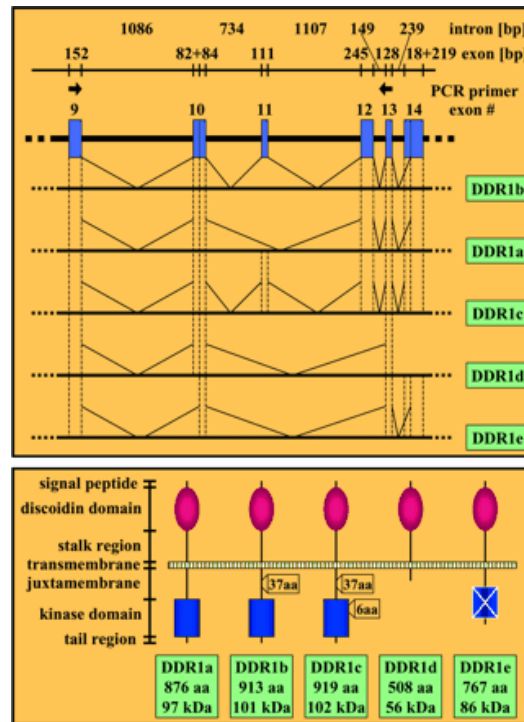


Abbildung 1.6 Splice-Varianten von DDR1 (aus Alves *et al.*, 2001). Im oberen Abschnitt ist die genomische Organisation des DDR1-Gens von Exon neun bis 14 gezeigt. Die untere Abbildung zeigt die daraus resultierenden Splicevarianten des DDR1 (aa: Aminosäure).

1.5.1 Die Expression von DDRs

DDR-Rezeptoren sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. DDR1 findet man unter anderem in Epithelzellen des Gehirns (Sanchez *et al.*, 1994), in der Milz, in der Lunge, in der Niere und in der Brustdrüse (Barker *et al.*, 1995). Außerdem hat man DDR1 in zahlreichen Tumoren überexprimiert gefunden, wie zum Beispiel in primären Brustkarzinomen (Barker *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1993), in Ovarialkarzinomen (Laval *et al.*, 1994), und in Hirntumoren (Weiner *et al.*, 1996). Im adulten Organismus findet man vorwiegend die b-Isoform des DDR1, während pränatal hauptsächlich DDR1a exprimiert wird (Sakuma *et al.*, 1995). Über das Vorkommen der anderen Splicevarianten im Organismus ist bislang nichts bekannt (Alves *et al.*, 2001).

Expression von DDR2 findet sich in mesenchymalen Geweben z. B. im Herz, in der quergestreiften Muskulatur, in der Lunge, der Niere und im Bindegewebe. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich die Expression von DDR1 und DDR2 gegenseitig auszuschließen scheinen. Dies ist besonders eindrucksvoll in Tumoren zu beobachten. Dort findet man DDR1 in den hochinvasiven Karzinomzellen, während sich DDR2 in Stromazellen und im Bindegewebe detektieren lässt, das die Tumorzellen umgibt (Alves *et al.*, 1995).

Die Expression von DDR1 lässt sich durch γ -Strahlung (Sakuma *et al.*, 1995) oder durch p53 induzieren. In der Promotor-Region des DDR1-Gens befindet sich eine putative Konsensus-Sequenz für die Bindung des Transkriptionsfaktors p53 (Sakuma *et al.*, 1996).

1.5.2 Kollagene als Signaltransduktionsmoleküle

Lange war der natürliche Ligand der DDRs unbekannt. Ein großer Schritt in der Entschlüsselung der Funktion von DDRs wurde 1997 gemacht, als Kollagen als Ligand der DDRs entdeckt wurde (Shrivastava *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1997). Zur Zeit sind etwa 27 verschiedene Kollagene bekannt (Boot-Handford *et al.*, 2003). Sie machen mit bis zu einem Viertel des Gesamtproteingewichts den größten Anteil an Proteinen im Körper aus. Kollagene kommen in großen Mengen in Haut, Knochen, Sehnen, Knorpeln und Zähnen vor und befinden sich auch sonst in fast allen Organen. Sie dienen in erster Linie dazu, die Zellen im Verband zu halten, haben aber auch eine Signalfunktion. Je nach Zusammensetzung können Kollagene ganz unterschiedliche Eigenschaften wie Härte, Zugfestigkeit oder Flexibilität besitzen.

Kollagene setzen sich aus jeweils drei gleichen oder unterschiedlichen α -Ketten zusammen, die fest umeinander gewunden sind (siehe Abbildung 1.7). Das Vorhandensein eines Glycinrestes an jeder dritten Position in der Aminosäuresequenz der Proteinketten macht es möglich, dass sich die drei Stränge fest umeinander wickeln können und eine nur im Kollagen zu findende Form einer Tripelhelix bilden. Diese Tripelhelix wird durch häufige Wiederholung des Tripeptid Glycin-Prolin-Hydroxyprolin in ihrer Primärsequenz weiter stabilisiert.

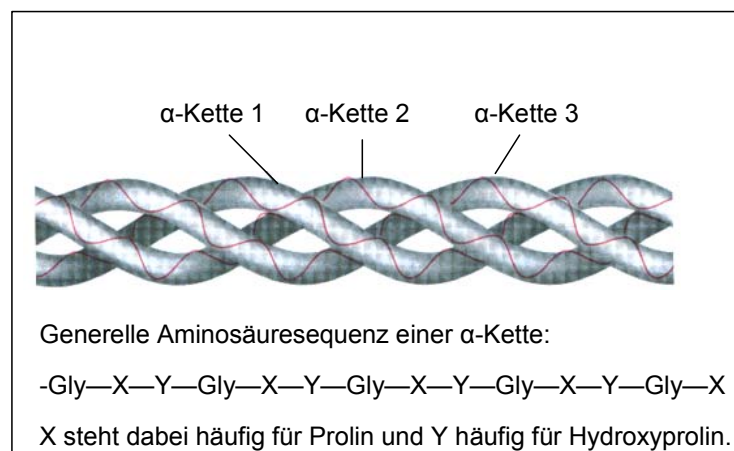


Abbildung 1.7 Aufbau und Struktur von Kollagen. Die generelle Primärsequenz eines Stranges sowie die räumliche Anordnung dreier alpha-Ketten ist gezeigt.

DDR1 kann von jedem bisher getesteten Kollagen (I-VI und VIII) aktiviert werden, während die Aktivierung von DDR2 lediglich mit Kollagenen möglich ist, die eine fibrilläre Struktur aufweisen (Kollagen I und III). Beiden Rezeptoren ist allerdings gemein, dass sie nur von nativem Kollagen, welches sich in der tripel-helikalen Struktur befindet, aktiviert werden können. Denaturiertes Kollagen (=Gelatine) ist nicht in der Lage, eine Phosphorylierung von DDR1 oder 2 zu bewirken (Vogel *et al.*, 1997). Für den DDR2-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass ferner die richtige Glykosylierung von Kollagen für eine Aktivierung des Rezeptors unabdinglich ist (Vogel *et al.*, 1997).

Kollagene können aber auch an andere Rezeptoren binden. Schon lange war bekannt, dass Integrine Kollagen binden können. Diese transmembranen Rezeptoren, die allerdings keine katalytische Aktivität besitzen, setzen sich aus α/β -Dimeren zusammen, die je nach Kombination Kollagene, Laminine oder Fibronektine binden können (zur Signalweiterleitung von Integrinen siehe Kapitel 1.3). Kollagen wird von Dimeren gebunden, die die Integrin-Untereinheit β_1 enthalten. Die Aktivierung der DDRs durch Kollagen ist aber unabhängig von β_1 -Integrin (Vogel *et al.*, 2000).

Hat Kollagen an DDR gebunden, kommt es durch die katalytische Kinasedomäne zu einer Transphosphorylierung des Rezeptors. Ob DDR nur als Dimer Kollagen bindet oder ob die Bindung von Kollagen zur Dimersierung und anschließend zur Phosphorylierung führt, ist noch unklar (Leitinger, 2003). Ein chimärer DDR2-Rezeptor, der aufgrund eines Austausches der extrazellulären Domäne gegen den Fc-Teil von Immunglobulin G spontan dimerisiert, ist jedenfalls konstitutiv aktiv und bedarf keines zusätzlichen Stimulus (Olaso *et al.*, 2001). Dies spricht dafür, dass der Rezeptor nicht dimerisieren muss, um Kollagen zu binden.

Ein weiteres Charakteristikum, welches die DDRs von den übrigen RTKs unterscheidet, ist ihre Aktivierungskinetik. Während viele RTKs innerhalb von Sekunden aktiviert werden - in der Regel tritt eine maximale Phosphorylierung innerhalb von einigen Minuten ein -, kann es bei den DDRs bis zu 18 Stunden dauern, bis die maximale Phosphorylierung erreicht ist (Vogel *et al.*, 1997).

1.5.3 Signaltransduktion von DDR1

Die Phosphorylierung des DDR1b-Rezeptors führt zur Generierung einer Binde-Konsensus-Sequenz für Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB). Diese Konsensus-Sequenz befindet sich in dem alternativ gesplizeten Insert von DDR1b und enthält auch den Tyrosin-Rest 513 (Vogel *et al.*, 1997). Zahlreiche Adaptorproteine bzw. Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Shc, Talin oder IRS1 enthalten solche PTBs. Sie binden an phosphorylierte Rezeptoren und geben das von außerhalb stammende Signal durch nachfolgende Phosphorylierung oder Rekrutierung anderer (Adaptor-) Proteine an das Innere der Zelle weiter.

In „pull-down“-Experimenten konnte die Bindung der PTB-Domäne von Shc an den phosphorylierten DDR1b-Rezeptor nachgewiesen werden (Vogel *et al.*, 1997). Dabei war keine Bindung von Shc an unphosphoryliertes DDR1b, noch an DDR1a, dem das Insert fehlt, zu beobachten. Ungewöhnlich ist jedoch, dass keine Phosphorylierung von Shc nach Bindung an den aktivierten DDR1b-Rezeptor gezeigt werden konnte. Dies ist aber Voraussetzung für die anschließende Rekrutierung des Grb2-SOS-Komplex, was zur Aktivierung des Ras/Raf/MAPK- (Mitogen aktivierte Proteinkinase) Signalweges führen würde. Eine solche Phosphorylierung von Shc und nachfolgende Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges konnte aber später in DDR1 überexprimierenden Monozyten gezeigt werden (Matsuyama *et al.*, 2003).

In Gefäßmuskelzellen, die aus DDR1-Knock-out-Mäusen isoliert wurden, war im Vergleich zu DDR1(+/-)-Zellen eine stark verringerte Menge von aktiviertem MMP2 und MMP9 zu finden, was die Vermutung nahelegt, dass DDR1 eine Rolle bei der Migration und Invasion von Gefäßmuskelzellen bei atherosklerotischen Veränderungen spielt (Hou *et al.*, 2002). Bei der Differenzierung von Myoblasten ist eine koordinierte Interaktion der Zellen mit der Matrix während der Proliferation, Migration und der Verlängerung zellulärer Fortsätze unabdingbar. Ebenso spielt DDR1 bei der Differenzierung von Neuronen eine große Rolle (Bhatt *et al.*, 2000). Die Anwesenheit von dominant negativem DDR1 reduziert das Auswachsen der Axone hin zu den Purkinje-Zellen.

Der Heilungsprozess nach arteriellen Verletzungen ist bei Abwesenheit von DDR1 gestört, das bedeutet, dass DDR1 bei der Verdickung der Intima (innerste Schicht von Blutgefäßen) eine wichtige Rolle innehat (Hou *et al.*, 2001).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass DDR1 ein direktes Zielgen von p53 ist (Ongusaha *et al.*, 2003). Bei Schäden in der DNA wird in Abhängigkeit von p53 die Transkription sowie die Phosphorylierung von DDR1 induziert. Schon 1996 wurde eine Konsensus-Sequenz für eine p53-Bindung im Promotor des DDR1-Gens postuliert (Sakuma *et al.*, 1996), allerdings fehlte ein kritisches Nukleotid in dieser Sequenz und auch Luciferase-Reporter-Assays konnten keinen Beweis für die Bindung von p53 an diese Sequenz und anschließende Transkription des Reportergens liefern. Erneute Analysen konnten schließlich eine funktionelle p53-Bindedomäne im dritten Intron des DDR1-Gens ausfindig machen (Ongusaha *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) wie auch Akt Zielgene des DDR1-Signalweges sind und durch eine positive Rückkopplung die Expression von p53 erhöhen. Überexpression von DDR1 schützt dabei vor p53 vermittelter Apoptose. Die Rolle von DDR1 bei der Brustdrüsenentwicklung ist ein zentraler Phänotyp der Knock-out-Maus und wird im Kapitel 1.5.5 und 1.5.6 ausführlich erläutert.

1.5.4 Signaltransduktion von DDR2

In der Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 führt die anhaltende Aktivierung von DDR2 durch Kollagen zu einer erhöhten Expression von MMP1 (Vogel *et al.*, 1997). MMP1 ist eine Protease, welche Kollagen degradiert. Es ist daher anzunehmen, dass eine erhöhte DDR2-Aktivierung zu einem Abbau der extrazellulären Matrix führt und damit eine Rolle bei der Invasion von Zellen spielt. In Leberzellen konnte eine Überexpression von MMP2 als Folge von aktiviertem DDR2 ermittelt werden (Olaso *et al.*, 2001).

Fibroblasten aus der Haut von DDR2(-/-)-Mäusen haben eine deutlich verringerte Fähigkeit, durch ein Matrigel zu migrieren, was eine direkte Konsequenz von verminderter MMP2-Expression ist. Ebenso ist die Expression von Kollagen I in diesen DDR2(-/-)-Fibroblasten reduziert (Olaso *et al.*, 2002).

Aktivierung von DDR2 führt des Weiteren zu einer Bindung des Adaptorproteins Shc an den Rezeptor (Ikeda *et al.*, 2002). Anders als bei DDR1 findet die Bindung allerdings zwischen der SH2-Domäne des Shc und dem Rezeptor statt. Die PTB-Domäne des Shc scheint bei dieser Interaktion keine Rolle zu spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kollagen induzierte Phosphorylierung von DDR2 abhängig von aktivem Src ist und dominant negatives Src die Phosphorylierung von DDR2 unterdrücken kann. Die Bindung von Shc an DDR2 ist also abhängig von aktiviertem Src (Ikeda *et al.*, 2002).

1.5.5 Die Rolle von DDR1 in der Brustdrüsenentwicklung

DDR1 ist in der Brustdrüse der Maus exprimiert und unterliegt dort einer starken Regulation. Mit Beginn der Schwangerschaft steigt die Expression in den epithelialen Zellen der Brustdrüse an, bis sie gegen Ende der Schwangerschaft ihr höchstes Niveau erreicht. Die erhöhte Expression hält während der Laktation an und nimmt beim Einsetzen der Involution wieder ab (Vogel *et al.*, 2001). Außerdem spielt DDR1 bei der Differenzierung eine wichtige Rolle, was der Phänotyp der DDR1-Knock-out-Maus beweist (s.u.).

1.5.6 Phänotyp der DDR1-Knock-out-Mäuse

Um weitere Einblicke in die Funktion von DDR1 und DDR2 zu gewinnen, wurden Knock-out-Mäuse generiert.

Im Fall der DDR1-Knock-out-Maus wurden durch homologe Rekombination die Exone 1 bis 12 deletiert (Vogel *et al.*, 2001). Da diese Sequenz auch das ATG-Startkodon enthält, wird DDR1 nicht mehr translatiert. Die Kreuzung heterozygoter Tiere bringt homo- und heterozygote Tiere im normalen Mendelschen Verhältnis von 1:2:1 hervor. DDR1(-/-)-Mäuse sind kleiner als heterozygote oder DDR1(+/-)-Mäuse. Die Ursache hierfür ist unklar, liegt aber nicht wie bei DDR2(-/-)-Mäusen an verminderter Proliferation der Chondrozyten (siehe dazu 1.5.7). Sie haben sehr häufig unnatürlich nach hinten gebogene Ohrmuscheln.

Nur 20 % der weiblichen DDR1-Knock-out-Mäuse werden schwanger. Dies ist auf die verminderte Fähigkeit der Blastozyste zurückzuführen, sich an das Uterusepithel anzuheften. Nach einer geglückten Schwangerschaft bringen DDR1(-/-)-Mäuse gesunde Junge zur Welt, die aber sehr bald an Unterernährung sterben. Der Grund hierfür ist in der Brustdrüse der Mutter zu finden, welche aufgrund ungenügender Differenzierung nicht in der Lage ist, zu laktieren. Einen Tag nach der Geburt ist in der Brustdrüse der Knock-out-Mäuse noch viel Fettgewebe zu sehen, während die Brustdrüse der heterozygoten bzw. Wildtyp-Mäuse vollständig von Alveolen ausgefüllt ist (siehe Abbildung 1.8). Gibt man die Neugeborenen zu Ammenmüttern, überleben sie. Dieser Phänotyp zeigt, dass DDR1 eine unverzichtbare Rolle bei der Differenzierung der Brustdrüse hat.

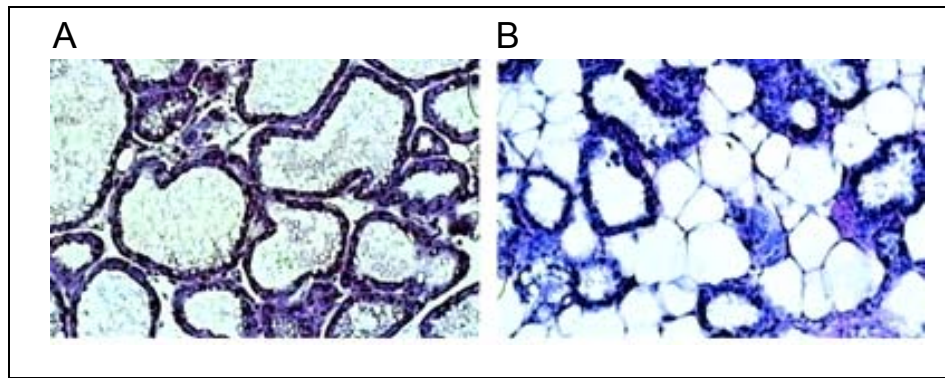


Abbildung 1.8 Die Brustdrüse von DDR1(-/-)-Mäusen ist ungenügend differenziert (aus Vogel *et al.*, 2001). Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte aus der Brustdrüse von DDR1(+/-)- (A) und DDR1(-/-)- (B) Mäusen einen Tag nach Geburt der Jungen. Die Brustdrüse der DDR1(+/-)-Maus ist vollständig von großlumigen Alveolen ausgefüllt, in denen sich Fetttropfen der Milch erkennen lassen. Dagegen sind in der Brustdrüse der DDR1(-/-)-Maus noch zahlreiche Adipozyten zu sehen. Die Alveolen haben ein kleines Lumen, in dem sich keine Fetttropfen befinden.

1.5.7 Phänotyp der DDR2-Knock-out-Mäuse

Um die Rolle von DDR2 näher zu untersuchen, wurden DDR2-Knock-out-Mäuse generiert (Labrador *et al.*, 2001). Dazu wurde das Exon K1, welches die ATP-Binderegion der Kinase-Domäne enthält, gegen eine Neomycin-Kassette ausgetauscht. Bei Geburt erscheinen die Mäuse normal, wachsen aber langsamer als ihre Geschwister und haben letztlich ein bis zu 40 % geringeres Gewicht. Das verminderte Gewicht lässt sich auf eine Verkürzung der langen Knochen zurückführen. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die Proliferation der Chondrozyten in den Wachstumsfugen der DDR2(-/-)-Knochen vermindert ist, während die Differenzierung sowie die Apoptoserate normal sind.

Ein Wundheilungs-Experiment zeigte ferner, dass in DDR2(-/-)-Mäusen die Wundheilung verlangsamt ist. Auch dies ist auf eine verminderte Proliferation der Haut-Fibroblasten zurückzuführen (Labrador *et al.*, 2001).

1.5.8 Die Rolle der DDRs bei Krebs

Eine Überexpression von DDR1 findet man in verschiedenen Tumoren wie primären Brustkarzinomen (Barker *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1993), in Ovarialkarzinomen (Laval *et al.*, 1994), Speiseröhrentumoren (Nemoto *et al.*, 1997) und pädiatrischen Hirntumoren (Weiner *et al.*, 1996). Außerdem wurde eine Überexpression von DDR1 in hochgradig malignen Hirntumoren gefunden, während keine Expression im tumorumgebenden Gewebe nachzuweisen war (Weiner *et al.*, 2000). Darüberhinaus exprimieren viele Tumorzelllinien wie T-47D, A431, SW48, SNU-C2B und Caki-2 DDR1 (Alves *et al.*, 1995).

In-situ-Experimente zeigten, dass DDR1 in invasiven Epithelzellen zu finden ist, während sich die Expression von DDR2 in dem Stromagewebe detektieren lässt, das den Tumor umgibt. Im Maus-Embryo wird DDR1 in proliferierenden Neuroepithel-Zellen stark exprimiert, während die Expression in differenzierten Zellen, die von der Proliferationszone bereits weggewandert sind, wesentlich schwächer bzw. nicht mehr vorhanden ist (Zerlin *et al.*, 1993). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Discoidin-Domain-Rezeptoren an der Interaktion zwischen neoplastischen Epithelzellen und dem umgebenden Stroma während der Tumor-Progression beteiligt sind (Alves *et al.*, 1995). Ebenso lässt sich eine Rolle der DDRs bei der Invasion und Migration annehmen, da sie die Transkription bzw. Aktivierung von Matrix-abbauenden Proteinen wie den MMPs fördern (Hou *et al.*, 2002; Olasso *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 1997), was eine Voraussetzung für Migration und Invasion ist.

1.6 Microarrays

1.6.1 Allgemeine Einführung

Die Analyse der Genexpression hat sich zum unverzichtbaren Werkzeug für die Erforschung von Ursachen und Folgen bei Krebserkrankungen entwickelt. Es gibt zahlreiche Methoden, mit deren Hilfe man (differenzielle) Genexpression detektieren und quantifizieren kann, wie z. B. Northern Blots (Alwine *et al.*, 1977), „differential display“ (Liang & Pardee, 1992) oder „nuclease protection assay“ (Berk & Sharp, 1977).

Diese Methoden haben aber den Nachteil, dass man mit ihrer Hilfe nur eine relativ kleine Anzahl von Genen gleichzeitig untersuchen kann.

Ein großer Fortschritt in der Analyse der Genexpression gelang mit der Einführung von Microarrays (auch Gen-Array, Gen-Chip oder in Analogie zur Computertechnologie einfach nur Chip genannt). Die ersten Versuche, einen solchen Array zu konzipieren, waren schon Anfang der 90er Jahre erfolgreich (Gress *et al.*, 1992; Lennon & Lehrach, 1991). Seit der ersten Beschreibung eines Arrays (Schena *et al.*, 1995), ist die Zahl der Veröffentlichungen über oder mit Hilfe von Microarrays sprunghaft angestiegen.

Microarrays sind im vereinfachten Sinne eine Abwandlung des Northern/Southern Blots. Während beim Northern oder Southern Blot eine Hybridisierung zwischen einem oder einigen wenigen markierten Oligonukleotiden in flüssiger Phase und immobilisierter RNA/DNA stattfindet, ist dieses Prinzip beim Microarray umgedreht und findet für viele Tausend Gensequenzen gleichzeitig statt (Duggan *et al.*, 1999).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Oligonukleotid-Arrays und cDNA-Arrays. Bei den Oligonukleotid-Arrays werden kurze, genspezifische Sequenzen - in der Regel 20mere - mittels Photolithographie direkt auf einem Glasträger synthetisiert und stehen anschließend zur Hybridisierung mit markierter DNA oder RNA zur Verfügung (Pease *et al.*, 1994). Diese Technik wird von der Firma Affymetrix vertrieben (www.affymetrix.com) und hat den Vorteil, dass sie die absolute Quantifizierung von Nukleotiden ermöglicht (Macgregor, 2003). Auf diese Oligonukleotid-Arrays soll hier aber nicht weiter eingegangen werden.

cDNA-Arrays werden hergestellt, indem man aufgereinigte, sequenz-verifizierte PCR-Produkte punktförmig auf eine Matrix (Glas, Nylon- oder Nitrozellulose-Membranen) aufträgt. Die ausgewählten PCR-Produkte haben üblicherweise eine Größe von 0,2-2,4 kb und stellen damit eine hohe Spezifität sicher.

Zur Anwendung von cDNA-Microarrays wird z. B. RNA aus Zellen oder Geweben isoliert, die jeweils zwei unterschiedliche Zustände darstellen, beispielsweise Tumorgewebe versus gesundes Gewebe oder behandelte gegen unbehandelte Zellen. Die RNA wird in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiert. Am weitesten verbreitet sind die Fluoreszenzmarker Cy5 und Cy3 (siehe 2.10.1 und 2.10.2). Die beiden cDNA-Pools werden dann gemeinsam auf den Chip aufgetragen und über Nacht mit der cDNA auf dem Array hybridisiert.

Nach Entfernung der nicht gebundenen cDNA wird der Array mit Hilfe eines Laserscanners eingelesen. Dazu wird die Fluoreszenz der beiden Farbstoffe mit Hilfe zweier Laser angeregt, über einen „Photomultiplier“ verstärkt und anschließend detektiert. Die unterschiedliche Höhe der beiden Signale gibt nach Normalisierung der Werte die Unterschiede in der Ausgangsmenge der RNA wieder.

1.6.2 Anwendungsgebiete für Microarrays

Die Anwendungsgebiete für Microarrays sind mannigfaltig. Außer der unten vorgestellten Möglichkeit, das Genexpressionsprofil für einen bestimmten Zustand zu erstellen, können mit Microarrays auch zahlreiche andere Fragestellungen beantwortet werden. Durch die Analyse von Tumormustern können zum Beispiel Tumormarker identifiziert werden, die nicht nur für die Diagnose und Klassifikation des Tumors eine Rolle spielen, sondern auch wichtige prognostische Funktionen haben sowie die Art der Behandlung beeinflussen können. Van de Vijver und Kollegen konnten zeigen, dass sich durch Untersuchung der Expressionshöhe von 70 Genen ein Profil erstellen lässt, das sehr verlässliche Prognosen über den Verlauf einer Krebserkrankung erlaubt (van de Vijver *et al.*, 2002).

Weiterhin ist vorstellbar, dass mit Genexpressionsanalysen die Ursachen für verschiedenste Erkrankungen ermittelt werden können. Therapeutische Zielgene, die während einer Erkrankung hoch- oder runterreguliert sind, können identifiziert werden. Die Suche nach Substanzen, die einen Einfluss auf die Expression therapeutischer Zielgene haben, ist möglich. Außerdem kann die Wirkungsweise eines Medikaments (und seiner Nebenwirkungen!) untersucht werden (Rosania *et al.*, 2000), was die Anwendung von Microarrays für die pharmazeutische Industrie interessant macht.

Es kann auch genomische DNA mit Microarrays untersucht werden. Bei Krebserkrankungen sind oft Gene oder ganze Abschnitte von Chromosomen amplifiziert. Solche „hot-spots“ können mit Microarrays untersucht, wie auch neu identifiziert werden (Pollack *et al.*, 1999). Umgekehrt können auch Genabschnitte fehlen oder umgeordnet sein, was ebenfalls zur Transformation führen kann, wenn sich dadurch die Expression der jeweiligen Gene, die in diesem Abschnitt enthalten sind, ändert. Dies kann z. B. zur Identifizierung neuer Tumorsuppressorgene beitragen.

1.6.3 Benutzung von Microarrays bei der Analyse differenzieller Genexpression

Eine der wichtigsten Anwendungsgebiete der Microarrays ist die Analyse der Genexpression. Die Summe der Gene, die von genomischer DNA transkribiert wird, wird auch als „Expressionsprofil“ oder „Transkriptom“ bezeichnet und ist ein Hauptmerkmal für den Phänotyp und die Funktion einer Zelle (Lockhart & Winzler, 2000). Unterschiede in der Genexpression sind verantwortlich für morphologische und phänotypische Unterschiede und sind Kennzeichen für zelluläre Reaktionen auf äußere Einflüsse. Die Anwendung von Microarrays ermöglicht es, in einem Experiment die Expression von tausenden von Genen gleichzeitig zu untersuchen. Dabei kann das Expressionsmuster eines unbekannten Gens auch Rückschlüsse auf dessen Funktion geben (Cho *et al.*, 1998).

1.7 Zielsetzung

Die Microarray-Technologie gewinnt - auch angetrieben durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms - rasant an Bedeutung für die Molekularbiologie. Was früher zahllose Experimente erforderte, kann heute mit Hilfe der Microarrays in wenigen Experimenten analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, dass die in Zusammenarbeit mit der Firma Memorec Stoffel in Köln entwickelten ECM-spezifischen Microarrays zur Auffindung differenziell regulierter Gene genutzt werden können. Damit sollten solche Gene identifiziert werden, deren Transkription durch die Expression von DDR1 und DDR2 beeinflusst wird.

Da die Abwesenheit des Rezeptors in DDR1-Knock-out-Mäusen zu einer verminderten Differenzierung der Brustdrüse und einem Ausbleiben der Laktation führt, sollten ferner Zielgene von DDR1 in der Brustdrüse identifiziert und die Rolle von DDR1 in der Brustdrüse erhellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide

Plasmid	Referenz
pRK5-DDR1b	(Alves <i>et al.</i> , 1995)
pRK5-DDR2	(Alves <i>et al.</i> , 1995)
pUHD-15	(Baasner <i>et al.</i> , 1996)
pTBC-1	(Baasner <i>et al.</i> , 1996)
pTBC-Hygro	(Baasner <i>et al.</i> , 1996)
pLXSN-DDR1b-Flag	W. Vogel, Toronto
pDSS4xGRE37tk-luc	AG Groner, Frankfurt
pCMV β Gal	Amersham Pharmacia

Generierte Konstrukte

Klonierung

pTBC-1DDR1b	DDR1b EcoRI/BamHI aus pRK5-DDR1b geschnitten und mit einem BamHI/Sall-Linker in den EcoRI/Sall geöffneten pTBC-1-Vektor ligiert
pTBC-1DDR2	DDR2 aus pRK5-DDR2 mit EcoRI/XhoI geschnitten und in den EcoRI/Sall geöffneten pTBC-1-Vektor ligiert

2.2 E.coli Stämme und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)

Plasmidhaltige Bakterien werden über Nacht bei 37° C und 200 rpm in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin angezogen.

2.3 Zelllinien und Medien

Allen genannten Zellkulturmedien wird 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin zugefügt

Zelllinie	Beschreibung	ATCC-Nr./Referenz	Medium
NIH3T3	murine Fibroblasten	CRL-1658	DMEM
HT1080	humanes Fibrosarkom	CLL-121	DMEM
HC11	nicht transformierte Brustepithelzellen	(Ball <i>et al.</i> , 1988)	RPMI 1640, 10 ng/ml EGF 5 µg/ml Insulin

2.4 Antikörper

Spezifität	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
Aktin	1:1000	polyklonal, Ziege	Santa Cruz (C-11)
β-Kasein	1:500	polyklonal, Kaninchen	Barash, I.; Bet Dagan, Israel
IRS1	IP, 5 µl WB 1:200	polyklonal Kaninchen	Santa Cruz (C-20)
DDR1 (aa 894-913)	1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz (C-20)
DDR2 (aa 836-855)	1:500	polyklonal, Ziege	Santa Cruz (C-19)
DDR1b	IP, 1µl	polyklonal	Alves, F. Göttingen
Flag	1:1000	monoklonal, Maus	Sigma Aldrich
Phospho-Tyrosin	1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz (PY99)
Phospho-Stat5a/b (Y694/699)	1:500	monoklonal, Maus	upstate
Stat5a/b	1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz (N-20)
Zweitantikörper:			
Anti-Kaninchen-IG- HRP	1:10000	polyklonal, Esel	Amersham, Pharmacia
Anti-Maus-IG-HRP	1:10000	polyklonal, Schaf	Amersham, Pharmacia
Anti-Ziege-IG-HRP	1:10000	polyklonal, Esel	Amersham, Pharmacia

2.5 Primer für die Real-time-PCR

Gen	Primer (5'-3')
Mm.21172 (Salivary protein)	TAG CTT CCC TGA CGA TCC CAG GAT ACT CTT TAT GCC ACC TGC CC
Mm.1650 (WDNMI)	CGC TTG TCC TAA GCC GCC TGC CAG AGC ACG ATC CAT C
Mm.86541 (Nocturin)	TAG GCT GAC AGC CAT GAC CC TCG CCC AGA CTC CTT GCA C
Mm.578 (IGFBP-5)	TCC TCT GCC CGA CTC AAA CAT AAG ATC CGG GCC TGA GTT GT
Mm.22220 (MDGI)	GGA CGC CTT TGT CGG TAC CT GCC CAC ACC GAG TGA CTT CAT
Mm.321 Osteopontin	GCT TTA CAG CCT GCA CCC AG GGC GCA AGG AGA TTC TGC T
Mm.9537 (neutrophil- gelatinase-assoziiertes Protein)	TGA GTG TGG CTG ACT GGG ATG AGG AAA GAT GGA GTG GCA GAC A
Mm.27953 (Glycin-Decarboxylase)	GGT GAG GAT GAT GCC TGG AAG TGG AGA GCG AGG CGA TAC AC
GAP-DH	GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC
β-Kasein	TCA CTC CAG CAT CCA GTC ACA GGC CCA AGA GAT GGC ACC A

2.6 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Grundchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsenzyme, andere Enzyme der Molekularbiologie und DNA-Größenstandards stammten, wenn nicht anders erwähnt, von New England Biolabs (Schwalbach). Protein-Größenstandards und Chemikalien zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden bei BioRad (München) bezogen, Einwegartikel für die Zellkultur bei den Firmen Greiner (Frickenhäusen), Becton Dickinson (Heidelberg) und Costar (Bodenheim).

Medien und Zusätze für die Zellkultur stammten von Invitrogen (Eggenstein), BioWhittaker (Verviers, Belgien) und Sigma (Deisenhofen). Zur Plasmid DNA-Isolierung, Aufreinigung von PCR-Fragmenten, RNA und mRNA Aufreinigung wurden Kits der Firma Qiagen (Eggenstein) verwendet.

2.7 Molekularbiologische Methoden

Falls nicht anders vermerkt, wird bei Standardmethoden sowie Zusammensetzung der Puffer nach Sambrook *et al.* (1989) vorgegangen. Abweichungen davon sind an den jeweiligen Stellen beschrieben.

2.7.1 Enzymatische Behandlung von DNA

2.7.1.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an für sie spezifischen Sequenzmotiven. Der Verdau von DNA erfolgt dabei nach Angaben des Enzymherstellers in den jeweiligen Puffersystemen. In der Regel werden 1 µg Plasmid-DNA mit zehn Einheiten des Enzyms zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Die Inkubationszeit sowie die Temperatur können variieren, grundsätzlich wird nach den Empfehlungen der Hersteller vorgegangen. Der Verdau wird durch Zugabe von 4fach Ladepuffer (20 % Glycerin, 100 mM EDTA, 0,25 % gesättigtes Bromphenolblau) abgestoppt.

2.7.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wird mit 1 µl T4-DNA-Ligase in dem zugehörigen Ligationspuffer durchgeführt. Die zu ligierenden Fragmente (in der Regel ein Vektorplasmid und ein Insert) werden idealerweise in einem Verhältnis von 1:3 in 20 µl Endvolumen bei 16° C für zwei Stunden oder über Nacht bei 4° C inkubiert und anschließend für die Transformation in *E.coli* eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wird stets eine Ligation ohne Insert angesetzt und ebenfalls in *E.coli* transformiert.

2.7.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten oder PCR Produkten wird die DNA einer Agarose-Gelelektrophorese unterworfen. Durch diese Methode kann man die Größe von Fragmenten anhand eines DNA-Längenstandards abschätzen, da die Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen Fragmente zur positiven Anode umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

Je nachdem, wie groß die zu trennenden Fragmente sind, werden 0,8-2 %ige TAE-gepufferte Agarose-Gele (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) verwendet, denen zum sichtbar Machen der DNA unter UV-Beleuchtung (366 nm) 0,0002 % Ethidiumbromid zugefügt wird. Die Auftrennung erfolgt im elektrischen Feld bei einer Spannung von 10 mV/cm Gellänge.

Wird die DNA für anschließende Ligationen benötigt, muss die Bande mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig aus dem Gel geschnitten werden. Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgt mit Hilfe von Gel-Extraktions-Kits der Firma Qiagen („QiaQuick“) laut Angaben des Herstellers.

2.7.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien werden folgende Lösungen verwendet:

Puffer 1: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KaAc, 10 mM CaCl₂, 13 % Glycerin (v/v)

Vorgehensweise: pH 5.8 mit Essigsäure einstellen (0,2M) und steril filtrieren.

Puffer 2: 10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 13 % Glycerin (v/v)

Vorgehensweise: pH 7 mit NaOH einstellen und steril filtrieren.

Eine Übernachtskultur wird 1:100 in 600 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37° C auf einem Schüttler angezogen. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 2000 rpm und 4° C wird das Zellpellet in 200 ml eiskaltem Puffer 1 resuspendiert und zwei Stunden auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für zehn Minuten bei 2000 rpm und 4° C wird das Pellet in 15 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert und in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80° C. Es empfiehlt sich, die Transformationsrate jeder Charge durch Transformation einer Plasmid-Verdünnungsreihe zu bestimmen (10⁻²-10⁻⁹ µg Plasmid).

2.7.4 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot chemokompetenter *E.coli*-Bakterien wird das zu transformierende Plasmid bzw. der Ligationansatz gegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch den anschließenden Hitzeschock für eine Minute bei 37° C wird die Aufnahme der Fremd-DNA begünstigt.

Die Zellen werden kurz auf Eis abgekühlt, durch Zugabe von 400 µl frischem LB-Medium verdünnt und zur Expression des Resistenzgens 30 Minuten bei 37° C vorkultiviert. Anschließend werden die Bakterien auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (in der Regel 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C wachsen gelassen. Am nächsten Tag werden die gebildeten Kolonien ausgezählt, wobei sich idealerweise auf der Platte der Negativkontrolle („Ligation“ ohne Insert) keine Kolonien befinden sollten bzw. deren Anzahl von denen der Ligation mit Insert weit übertroffen werden sollte. Die erfolgreiche Ligation wird durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.7.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

2.7.5.1 Plasmidisolierung in analytischem Maßstab (Mini-Präparation)

Für analytische Zwecke wird Plasmid-DNA aus einer kleinen Menge *E.coli*-Flüssigkultur (1,5ml) aufgereinigt. Sie erfolgt mit Kits der Firma Qiagen.

2.7.5.2 Plasmidisolierung in präparativem Maßstab (Maxi-Präparation)

Für die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA (500µg) wird das Maxi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

2.7.5.3 Photometrische Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Die Messung der Extinktion von verdünnten DNA/RNA-Lösungen bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über Konzentration und Reinheit der präparierten Nukleinsäure. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw 40 µg/ml RNA. Die Konzentration der Probe errechnet sich daher wie folgt :

$$\text{DNA Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

$$\text{RNA Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{Extinktion}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Da aromatische Aminosäuren Licht der Wellenlänge 280 stärker absorbieren als DNA, kann der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ zur Beurteilung der Reinheit verwendet werden. Liegt dieser Wert unter 1,8, deutet dies auf Verunreinigung der DNA-Präparation mit Proteinen hin.

Für die Messung wird die DNA/RNA je nach vermuteter Konzentration zwischen 1:50 und 1:200 mit Wasser verdünnt.

2.8 RNA-Aufreinigung und Analytik

Beim Arbeiten mit RNA muss dafür Sorge getragen werden, dass alle Lösungen RNase-frei sind und beim Umgang mit Lösungen oder Geräten, welche mit RNA in Berührung kommen, immer Handschuhe getragen werden, da RNAsen insbesondere auf der Haut zu finden sind.

2.8.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA findet unter Verwendung der RNeasy-Kits (Qiagen) laut Angabe des Herstellers statt. Je nach Menge der benötigten RNA werden Mini- oder Midi-Kits verwendet. Zellen werden zunächst trypsiniert (siehe 2.11.2), abzentrifugiert und das Pellet anschließend in Lysispuffer aufgenommen. Gewebe wird sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolierung wird es direkt im Lysispuffer aufgetaut und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert.

Nach der Aufreinigung mit Hilfe der Qiagen RNA-Säulen wird ein Aliquot der RNA mit RNase freiem Wasser verdünnt und die Konzentration wie unter 2.7.5.3 beschrieben ermittelt.

2.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA gibt nicht unbedingt Aufschluss über deren Intaktheit. Daher ist es bei Arbeiten mit RNA ratsam, vor einem Experiment die Qualität der RNA zu überprüfen. Bei Auftrennung von Gesamt-RNA mit Hilfe der Gelelektrophorese ist nach dem Lauf bei Anregung mit ultraviolettem Licht lediglich die ribosomale RNA (18S und 28S) zu erkennen, welche fast 90 % der Gesamt-RNA ausmacht. Diese beiden Banden (1,9 und 4,7 bp bei der Maus) ermöglichen aber eine Abschätzung, ob die empfindliche RNA während der Präparation bereits teilweise oder völlig degradiert ist. Sind die beiden rRNA Banden scharf und ist zudem kein „Schmier“ in der Spur zu sehen, so kann davon ausgegangen werden, dass auch die mRNA intakt ist. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgt wie schon für DNA beschrieben. Der Lauf findet in FA-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAcetat, 1 mM EDTA, 20 ml 37 %iges Formaldehyd, mit NaOH auf pH7) statt. Die RNA wird vor dem Auftragen auf das Gel zehn Minuten bei 65°C im Ladepuffer (16 μl gesättigtes Bromphenolblau, 80 μl EDTA pH 8, 720 μl Formaldehyd 37 %, 2 ml Glycerin, 3084 μl Formamid, 4 ml 10fach FA-Puffer mit H_2O ad 10 ml) denaturiert.

2.8.3 Isolierung von mRNA

Für die Anwendung der Memorec Arrays ist es notwendig, mRNA aus der Gesamt-RNA zu isolieren. Dies geschieht mit dem Qiagen Kit Oligotex nach Angaben des Herstellers. Für ein Microarray-Experiment wird mRNA aus 100 µg Total-RNA je Probe isoliert.

Zur Kontrolle, ob die mRNA Aufreinigung erfolgreich war, wird jeder Probe vorher eine synthetische mRNA (Memorec, Köln) zugesetzt, welche später auf dem Array detektiert wird.

2.9 Real-time-PCR

Zur Bestätigung der Microarray-Daten wurde die Real-time-PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green durchgeführt (Bustin, 2000). Die Fluoreszenz von SYBR-Green steigt rapide an, wenn es in doppelsträngige DNA interkaliert. Anhand der Größe des Fluoreszenzsignals kann man damit auf die Menge an vorhandener DNA schließen. Durch die Aufnahme des Fluoreszenzsignals ist es daher möglich, mit einem Real-time-PCR-Gerät die Zunahme an DNA während einer PCR zu verfolgen. Weil SYBR-Green aber unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, muss nach einem PCR-Lauf sichergestellt werden, dass nur ein Produkt gebildet worden ist. Dafür wird eine Schmelzkurve aufgenommen, welche das traditionelle Agarose-Gel nach der PCR ersetzt. Bei der Temperatur, bei der das gebildete DNA-Produkt schmilzt (d.h. die beiden Stränge der DNA sich voneinander lösen), nimmt die Fluoreszenz des SYBR-Greens schlagartig ab. Sind während der PCR verschiedene Produkte gebildet worden, findet man mehrere Peaks in der Schmelzkurve, da die Schmelztemperatur spezifisch für jedes DNA-Fragment ist. SYBR-Green unterscheidet nicht zwischen unterschiedlichen DNA-Produkten, so dass sich in dem Fall (mehrere Peaks in der Schmelzkurve) die Real-time-PCR nicht mehr zur Quantifizierung der Ausgangs-cDNA Menge eines Gens verwenden lässt.

2.9.1 Umschreiben von RNA in cDNA

Zur Quantifizierung von spezifischer mRNA in der Real-time-PCR wird die zu untersuchende RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Dazu wird eine reverse Transkriptase (Superscript II™, Invitrogen) in dem dazugehörigen Puffer verwendet, wobei 10 µg Total-RNA in einem Endvolumen von 20 µl umgeschrieben werden.

Ansatz: 10 µg RNA
1 µl AncT-Primer (100pM)
2 µl 5fach 1st strand buffer (Invitrogen)
→ zehn Minuten bei 70° C denaturieren

4 µl DTT
1 µl dNTP Mix (10mM)
2 µl Superscript II™ (Invitrogen)
→ eine Stunde bei 42° C inkubieren

AncT-Primer: T₍₂₀₎VN, wobei V= jede Base außer T und N jede beliebige Base.
Zur Benutzung in der Real-time-PCR wird die cDNA anschließend 1:10 mit Wasser verdünnt.

2.9.2 Primerdesign für Real-time-Experimente

Idealerweise sollte ein Primerpaar für die Real-time-PCR ein Genfragment von 100 bp amplifizieren, ihre Schmelztemperatur etwa 60° C, mindestens aber 58° C betragen und sie sollten etwa 21 bp lang sein. Die Länge des entstehenden Amplikons ist bei einer quantitativen PCR wichtig, da eine Quantifizierung des entstandenen Produkts auf der Effizienz der Amplifikation beruht. Je kleiner das Produkt, desto effizienter läuft theoretisch die Verdopplung. Natürlich spielen dabei noch Faktoren wie Temperatur, Pufferbedingungen oder Sekundärstruktur der Primer eine Rolle. Zum Auffinden optimaler Primer wurde die „Primer-Express“-Software (Applied Biosystems) verwendet. Die Software hilft, Primer zu finden, bei welchen die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Primer-Dimeren sowie von intramolekularen Bindungen möglichst gering ist.

2.9.3 Durchführung der Real-time-Experimente

Die Überprüfung der OCI Microarray-Ergebnisse fand durch Anwendung der Real-time-PCR unter Benutzung des Taqman 7700™ der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) statt. Dieses Gerät erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von 384 Proben.

Die umgeschriebene und bereits verdünnte cDNA wird nochmals 1:2 und 1:10 mit Wasser verdünnt, dem zur besseren Sicht blaue Lebensmittelfarbe zugesetzt wird. Die Real-time-PCR im Taqman-Gerät wird mit dem vom Hersteller empfohlenen SYBR-Green-Mix (Applied Biosystem, Darmstadt) durchgeführt.

In diesem Fertigmix sind alle Bestandteile wie DNA-Polymerase, Puffer, dNTPs, Referenzfarbstoff und SYBR-Green enthalten. Für jedes Gen werden zwei cDNA-Verdünnungen getestet und jede Probe wird einer Vierfach-Bestimmung unterzogen.

Pipettierschema:

- 4 µl verdünnte cDNA (1:2 und 1:10)
- 0,1 µl 5'Primer (100pM)
- 0,1 µl 3'Primer (100pM)
- 5 µl SYBR-Green PCR-Master-Mix™

Die PCR wird standardmäßig mit folgendem Protokoll gefahren (Empfehlung des Herstellers):

- 2 Minuten 50° C
- 10 Minuten 95° C
- 40 Zyklen der folgenden Schritte:
 - 15 Sekunden 95° C
 - 1 Minute 60° C

Schmelzkurve:

- 15 Sekunden 95° C
- 15 Sekunden 60° C
- von 60° C bis 100° C in 0,5° C Schritten je 15 Sekunden.

Zur Analyse der Menge an β -Kasein-Transkript wurde ein anderes Real-time-PCR-Gerät verwendet, nämlich der iCycler der Firma BioRad, da das Taqman Gerät nicht mehr zur Verfügung stand.

Für diese Real-time-PCR wird ein selbst angesetzter SYBR®-Green (Molecular Probes, USA)-Mix verwendet. Er setzt sich wie folgt zusammen:

- 5 µl verdünnte cDNA (1:5 und 1:50)
- 5 µl AmpliTaq-Polymerase™ Puffer mit MgCl₂ (Invitrogen)
- 0,5 µl 5'Primer (100pM)
- 0,5 µl 3'Primer (100pM)
- 0,5 µl dNTPs (10mM)
- 5 µl SYBR®-Green (Stammlösung 1:10 in DMSO, 1: 1000 mit Wasser verdünnt)
- 0,4 µl AmpliTaq™ DNA-Polymerase (Invitrogen)
- auf 50 µl Gesamtvolumen mit Wasser auffüllen.

Jede Probe wird mindestens einer Dreifach-Bestimmung unterzogen.

Der selbst angesetzte PCR-Mix enthält keinen Referenzfarbstoff, daher muss das PCR-Gerät vor jedem Lauf kalibriert werden. Dazu wird eine von der Firma BioRad zur Verfügung gestellte Kalibrierungslösung verwendet („well factor solution 10x“, BioRad). Sie wird 1:10 mit Wasser verdünnt, 50 µl der Lösung in jedes Loch einer 96-Lochplatte pipettiert und ein Kalibrierungslauf gestartet (drei Zyklen 95° C für 10 Sekunden und 60° C für 30 Sekunden, einmal 90 Sekunden 60° C). Der PCR Lauf findet unter den folgenden Bedingungen statt:

5 Minuten 95° C

40 Zyklen:

1 Minute 95° C

1 Minute 60° C

Schmelzkurve:

60° C bis 100° C in 0,5° C Schritten je 10 Sekunden.

2.9.4 Auswertung der Real-time-PCR

Zur Auswertung der Real-time-PCR (sowohl mit dem Taqman als auch mit dem iCycler erhaltene Daten) werden zunächst die Schmelzkurven aller Proben, die mit einem Primerpaar generiert wurden, angesehen. Sind hier mehrere Peaks zu sehen, sind die Daten für eine weitere Analyse unbrauchbar. Schmelztemperaturen von weniger als 70° C deuten auf Primer-Dimere hin, daher muss die Amplifikationskurve dieses Primerpaares genau betrachtet werden. Idealerweise stellen die Amplifikationskurven eine sigmoide Kurve dar. Je steiler diese ist, desto effizienter lief die Amplifikation der DNA und desto genauer kann die Ausgangsmenge ermittelt werden.

Die Schwellenwert-Grenze wird nun in den linearen Bereich der sigmoiden Kurve gesetzt. Die Gerätesoftware errechnet dann für jede Probe die Zyklenzahl, die benötigt wurde, um diesen Schwellenwert zu erreichen (= Ct-Wert, „threshold cycle“). Je kleiner dieser Wert ist, desto mehr cDNA (welcher der mRNA des Gens entspricht) befand sich in der Ausgangsprobe.

Als weiterer Anhaltspunkt für die Effizienz der PCR können die cDNA Verdünnungen dienen. Eine Verdünnung von 1:10 sollte idealerweise einen Unterschied von 3,3 Ct-Werten ausmachen, wenn die PCR mit 100 %iger Effizienz (= Verdopplung der DNA) gelaufen ist.

Um cDNA-Proben miteinander vergleichen zu können, muss sichergestellt werden, dass nicht schon bei der Präparation der RNA oder aber bei der cDNA-Synthese Unterschiede auftraten.

Dies kann entweder durch gleichzeitige Analyse eines Haushaltsgens wie GAP-DH (Glycerin-Aldehydphosphat Dehydrogenase) geschehen, dessen Expression sich in den zu vergleichenden Proben nicht unterscheiden sollte, oder aber durch gleichzeitige Verwendung der präparierten cDNA für die Untersuchung zahlreicher Gene. Findet man bei der Analyse hochregulierte und runterregulierte Gene sowie Gene, deren Transkription in den beiden Proben gleich ist, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass zumindest bei der Präparation der RNA und cDNA keine Fehler aufgetreten sind. Nicht ausgeschlossen werden können dabei Pipettierfehler beim Ansetzen der Real-time-PCR.

2.10 Microarray Analytik

2.10.1 ECM-spezifische Arrays

Das Protokoll für die Durchführung der Microarray-Hybridisierung wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Memorec erstellt. Die genannten Lösungen sind von der Firma Memorec zu beziehen. Je 100 µg Total-RNA werden wie unter 2.8.3 beschrieben zur mRNA Aufreinigung verwendet. Das Endvolumen wird auf 17 µl eingestellt (bei Bedarf wird das Volumen mit Hilfe der Vakuumzentrifuge verringert oder mit Wasser korrigiert) und 2 µl Kontroll-RNA (Memorec, Köln) zugegeben.

Anschließend wird für jede Probe der folgende Mix hergestellt:

- 8 µl 5x „first strand buffer“ (Invitrogen)
- 2 µl Primer Mix (Memorec)
- 2 µl dNTP Mix (10 mM dATP, dGTP, dTTP und 4 mM dCTP)
- 2 µl FluoroLink™ Cy3 oder Cy5 dCTP (Amersham)
- 4 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
- 1 µl Rnasin™ (Promega)

Der Mix wird mit den 19 µl der isolierten mRNA kombiniert (Kontroll-Probe wird in der Regel mit Cy3, die andere mit Cy5 markiert) und fünf Minuten bei 65° C inkubiert. Die beiden Proben werden auf 42° C abgekühlt und je 1 µl Superscript II™ (Invitrogen) reverse Transkriptase zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 42° C wird zu jeder Probe erneut 1 µl reverse Transkriptase zugefügt und weitere 30 Minuten bei 42° C inkubiert.

Zum Abbau der RNA wird nun jede Probe mit 0,5 µl RNase H (Promega) 20 Minuten bei 37° C behandelt.

Nach der Zusammenführung der beiden Cy3 und Cy5 markierten Proben erfolgt die Abtrennung der nicht inkoooperierten Nukleotide mit Hilfe des „PCR purification kit“ der Firma Qiagen. Dabei wird nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Anschließend wird das Probenvolumen mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge auf 10 µl reduziert. Diese werden mit 10 µl auf 42° C vorgewärmtem Hybridisierungspuffer (Memorec, Köln) verdünnt, direkt auf den Array gegeben und mit einem Deckglass abgedeckt. Der Array muss zuvor durch zweiminütiges Kochen in Wasser gebrauchsfertig gemacht werden (einzelsträngig Machen der auf den Array gedruckten DNA). Außerdem erfolgt eine Prähybridisierung des Arrays für mindestens 30 Minuten bei 62° C mit Prähybridisierungslösung (Memorec, Köln). Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in einer feuchten Hybridisierungskammer (Memorec, Köln), die in einem für 96-Lochplatten geeignetes PCR-Gerät auf konstant 62° C erwärmt wird. Am nächsten Tag wird die ungebundene cDNA durch zweimal fünf Minuten Waschen bei 50° C in Waschpuffer 1 (Memorec, Köln) und zweimal fünf Minuten bei 50° C in Waschpuffer 2 (Memorec, Köln) entfernt. Das Einscannen und Auswerten der Arrays findet bei der Firma Memorec statt.

2.10.1.1 Auswertung der ECM-Arrays

Das Einlesen der Arrays findet im ScanArray™ 3000 (GSI Lumonics, USA) mit Hilfe der ImaGene™ Software 4.1 (BioDiscovery, USA) statt. Jeder Spot wird in einem Ø 350 µm großen Kreis gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz wird in einem Ø 40 µm großen Kreis um den eigentlichen Spot herum ermittelt und vom Signal abgezogen. In die weitere Auswertung werden nur solche Spots mit einbezogen, deren Fluoreszenzintensität in mindestens einem der beiden Kanäle größer ist als die zweifache Intensität der Negativkontrolle (Heringssperma und SSC Buffer). Der Quotient aus Cy5 und Cy3 wird gebildet und normalisiert. Dazu werden die Werte mit dem Median aller Quotienten multipliziert.

Die Clusteranalyse wird von der Firma Memorec mit der CLUSTER Software von Mike Eisen durchgeführt (Eisen *et al.*, 1998).

2.10.2 OCI-Arrays

Das Protokoll für das Markieren und Hybridisieren der Arrays des Ontario Cancer Institutes ist unter www.microarrays.ca nachzulesen. Im Folgenden wird es kurz zusammengefasst. Für die Hybridisierung werden 10 µg Total-RNA verwendet. Es wird zunächst ein Mastermix hergestellt, wobei für jede Probe folgende Mengen benötigt werden:

8 µl „first strand buffer“ (Invitrogen)
1,5 µl AncT-Primer (100 pmol/µl)
3 µl dNTPs (20 mM ohne dCTP)
1 µl dCTP (2 mM)
4 µl DTT (0,1 M)
11,5 µl H₂O

29 µl des Mastermixes, 10 µg Total-RNA in 10 µl Gesamtvolumen sowie 1 µl Cy3- oder Cy5-dCTP werden kombiniert, 2 µl reverse Transkriptase (Superscript II™, Invitrogen) zugegeben und zwei Stunden bei 42° C inkubiert. Nach dem Umschreiben in cDNA wird die RNA durch Zugabe von 4 µl EDTA (50 mM pH8) und 2 µl NaOH (10 M) bei 65° C 20 Minuten lang hydrolysiert. Der pH-Wert wird anschließend durch Zugabe von 4 µl Essigsäure (5 M) wieder neutralisiert. Die Cy3-dCTP und Cy5-dCTP markierten Proben werden vereinigt und mit Hilfe von Microcon Säulen (Millipore, Schwalbach) die nicht eingebauten Nukleotide abgetrennt. Dabei wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die aufgereinigte Probe wird mit 80 µl Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb (Roche, Basel), 8 µl Kalbsthymus-DNA 10 mg/ml und 8 µl Hefe-tRNA 10 mg/ml) kombiniert und drei Minuten bei 65° C inkubiert. Anschließend wird die Lösung direkt auf den Array pipettiert (keine Vorbehandlung nötig), mit einem Deckglas abgedeckt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37° C hybridisiert.

Am nächsten Tag wird die nicht gebundene cDNA durch drei Waschschriffe in einfach SSC-Puffer (150 mM NaCl, 15 mM NaCitrat) 0,1 % SDS 10-15 Minuten bei 50° C entfernt. Zuletzt wird das SDS durch kurzes Waschen in 0,1fachem SSC-Puffer entfernt.

2.10.2.1 Auswertung der Arrays

Die Arrays werden mit dem GenePix™ Laserscanner (Axon, USA) eingelesen. Dabei wird die Stärke der Laser so reguliert, dass die Summe der Signale in beiden Kanälen etwa gleich groß ist. Dies ermöglicht bereits eine erste Normalisierung.

Die Bilder werden mit der Geräte-Software ausgewertet und die gewonnenen Signalintensitäten mit Excel weiterverarbeitet. Dazu werden von jedem Spot die Mediane des Cy3- und Cy5-Kanals der Hintergrundbereinigten Signalintensitäten sowie der Median der Cy3/Cy5-Quotienten verwendet. Es gehen nur solche Messwerte in die weitere Analyse ein, die nicht von der GenePix™ Software als fehlerhaft markiert worden sind (zu niedrige Werte, unregelmäßige Spots usw.).

Zur Normalisierung werden die Quotienten der einzelnen Spots mit dem von der Software errechneten Normalisierungsfaktor (Median aller Quotienten) multipliziert. Da bei den „Cy-flip“-Ansätzen die Markierung mit Cy3 und Cy5 vertauscht ist, wird bei diesen der Kehrwert der Quotienten gebildet, um den anschließenden Vergleich zu vereinfachen. Der Schwellenwert für die Summe der Hintergrund-bereinigten Messwerte für Cy3 und Cy5 wird auf 300 festgelegt. Dieser Wert muss erreicht werden, damit die Ergebnisse für den jeweiligen Spot in die weitere Analyse mit einbezogen werden. Danach werden die Daten gefiltert, indem die Quotienten der Signalintensitäten, welche nicht größer als 1,4 (für hochregulierte Gene) bzw. kleiner als 0,7 (für reprimierte Gene) sind, von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Dabei muss ein Spot sowohl in „normalen“ Ansatz als auch im „Cy-flip“-Ansatz diesen Kriterien entsprechen. Bei der Zusammenführung verschiedener Experimente wird ebenso verfahren. Gegebenenfalls werden die Schwellenwerte der Quotienten erniedrigt.

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Auftauen und Einfrieren von Säugerzellen

Das Auftauen von Säugerzellen aus der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff erfolgt durch schnelle Erwärmung des Kryoröhrchens bei 37° C. Gleich nach dem Auftauen werden sie in kaltes Kulturmedium überführt und bei 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche bei 37° C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Am nächsten Tag wird der Zustand der Zellen überprüft und evtl. das Medium gewechselt.

Zum Einfrieren werden die Zellen aus einer fast konfluenten Kulturflasche durch Trypsinierung abgelöst, abzentrifugiert und anschließend in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert und einige Tage bei -80° C gelagert, bevor sie in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt werden.

Für empfindlichere Zellen, wie z. B. Primärzellen, wird 95 % FCS mit 5 % DMSO als Einfriermedium verwendet.

2.11.2 Subkultivierung von adhärenenten Säugerzellen

Die adhärenenten Zellen werden bei 37° C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz werden die Zellen so lange mit Trypsin/EDTA bei 37° C inkubiert, bis sie sich durch leichtes Schlagen ablösen lassen (ca. 5 Minuten). Die Zellen werden dann abzentrifugiert und je nach Zelllinie mit einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10 passagiert.

2.11.3 Transfektion von Säugerzellen

Säugerzellen können unter bestimmten Bedingungen von außen zugesetzte DNA aufnehmen und die von dieser DNA kodierten Gene exprimieren.

2.11.3.1 Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitation

Die zu transfizierenden Zellen werden am Vortag so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 70 % erreichen. Vier Stunden vor der Transfektion wird das Medium gewechselt.

Für die Herstellung des Präzipitats (ausreichend für die Transfektion einer T25cm² Kulturflasche) werden folgende Komponenten gemischt:

25 µl CaCl₂ (2,5 M)

5 µg Plasmid-DNA

Außerdem bei stabilen Transfektionen:

0,5 µg Selektionsplasmid (kodiert für das Resistenzgen)

auf 250µl mit sterilem Wasser auffüllen und unter Aufwirbeln mit 250 µl zweifach HEBS-Puffer (50 mM Hepes pH 7, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl, 1,5 M Na₂PO₄) mischen. Das Gemisch wird etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich das Präzipitat bilden kann und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wird das Kulturmedium gewechselt und nach einem weiteren Tag kann entweder die Expression des transfizierten Gens untersucht werden oder bei stabilen Transfektionen mit der Selektion begonnen werden. Diese Methode kann bei Benutzung von RPMI nicht angewendet werden, da es sofort zu einer Trübung des Mediums kommt. Für die Zeit der Transfektion muss daher ein anderes Medium wie z. B. DMEM verwendet werden.

Bei der stabilen Transfektion werden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Selektionsmedium behandelt. Zur Sicherstellung, dass eine für die Zelllinie geeignete Antibiotikum-Konzentration verwendet wurde, ist unbedingt eine Negativ-Transfektion ohne Selektionsplasmid durchzuführen. Die Analyse der erhaltenen Zellklone verspricht dann Erfolg, wenn die Zellen der Negativkontrolle durch das Antibiotikum alle ausgesiebt wurden bzw. nur ganz wenige Zellklone überlebten.

2.11.3.2 Lipofectamin

Für die Transfektion mit Lipofectamin™ (Invitrogen) werden die Zellen in einer 12-Lochplatte so ausgesetzt, dass am Tag der Transfektion eine 90 %ige Konfluenz erreicht ist. Die Zellen werden in serum-reduziertem OptiMem™ Medium (Invitrogen) ohne Antibiotika-Zusätze transfiziert.

Für jedes Loch werden 2 µg DNA mit 100 µl OptiMem™ Medium und 4 µl Lipofectamin™ mit weiteren 100 µl OptiMem™ gemischt. Zur Bildung der DNA-Lipofectamin-Komplexe werden die dann vereinigten Lösungen 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf die Zellen pipettiert und für sechs Stunden auf den Zellen belassen. Nach 48 Stunden kann die Expression des Gens untersucht werden.

Für den Luciferase-Assay in HC11 (siehe 3.4.8.1) werden 1 µg pDSS4xGRE Luciferase-Reporterplasmid und 50 ng β-Galactosidase-Plasmid transfiziert. Die Zellen werden direkt nach der Transfektion in Medium ohne EGF gegeben und am nächsten Tag für 24 Stunden mit DIP induziert.

2.11.3.3 Retrovirale Transduktion von Säugerzellen

Die effektivste Methode, fremde DNA in Säugerzellen einzubringen, ist die retrovirale Transduktion. Dazu werden sog. Verpackungszellen (in diesem Fall GPE-Zellen) mit dem retroviralen Vektor transfiziert (Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitation). Die Zellen werden nach der Transfektion durch Zugabe von G418 selektiert und die erhaltenen Klone auf die Virusproduktion untersucht. Ein solcher Klon gibt kontinuierlich Viren in den Überstand ab, welcher nach Abtrennung von Zellbestandteilen durch Zentrifugation (10 Minuten bei 2000 rpm) oder Sterilfiltration direkt für die Transduktion von Zielzellen zur Verfügung steht.

Die Zellen sollen zum Zeitpunkt der Transduktion in nicht allzu hoher Dichte (etwa 50 %) vorliegen. Etwa 5 ml des Virusüberstands versetzt mit 4 mg/ml Polybrene werden auf die Zellkulturschale gegeben (Ø 10cm) und nach 12 Stunden gegen frischen Virusüberstand mit Polybrene ausgetauscht. Nach weiteren 12 Stunden erfolgt erneut ein Auswechseln.

Zwei Tage nach der Transduktion werden die Zellen mit G418 selektiert. Überlebende Zellen werden anschließend auf die Expression des transduzierten Gens analysiert.

2.11.4 Lysieren von Säugerzellen

Zum Lysieren der Zellen wird das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um eventuelle Mediumreste zu entfernen und anschließend durch Zugabe von Lysispuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 % Triton-X 100, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM NaVanadat, 10 μ g/ml Aprotinin) direkt auf der Zellkulturplatte lysiert. Dazu werden die Zellen fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird das Zelllysate mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gekratzt und unlösliche Zellbestandteile durch zehn Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm und 4° C abgetrennt. Zellysate werden bei -80° C aufbewahrt. Wenn nötig, wird die Protein-Konzentration der Lysate mittels Bradford-Methode bestimmt (siehe 2.12.1).

2.11.5 Luciferase- und β -Galaktosidase-Test

Im Luciferase-Test wird ein Reporterplasmid, welches das Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors enthält, transfiziert, um die Wirkung von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

Die Enzymaktivität wird 48 Stunden nach der Transfektion getestet. Dazu wird das Medium abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie direkt auf der 12-Lochplatte mit 50 μ l/Loch Luciferase-Lysispuffer (1 % Triton X-100, 25 mM Glycylglycin, 15 mM $MgSO_4$, 4 mM EGTA, 1 mM DTT) fünf Minuten auf Eis lysiert. Das Lysat wird durch zehnminütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4° C von den unlöslichen Zellbestandteilen befreit und direkt für den Luciferase-Assay eingesetzt. Dazu werden je 10 μ l (Dreifach-Bestimmung) Lysat in eine 96-Lochplatte pipettiert. Die Messung findet am Luminometer statt, das automatisch 60 μ l des Luciferase-Substrats (0,33 g Glycylglycin, 0,3 g ATP, pH 7,8, 5,6 mg Luciferin ad 100 ml H_2O) in jedes Loch gibt und die Lumineszenz anschließend 20 Sekunden lang misst.

Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität, welche Aufschluss über die Transfektionseffizienz gibt und es ermöglicht, die auftretenden Schwankungen abzugleichen, werden je 3 μ l des Luciferase-Lysats in eine 96-Lochplatte pipettiert (Dreifach-Bestimmung).

Es werden je 33 µl Reaktionspuffer zugegeben (200 µl Na₃PO₄ pH 8, 1 µl 1 M MgCl₂, 10 µl 100x Galacton (Tropix) ad 1 ml mit H₂O) und 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit (mit einer Aluminiumfolie abgedeckt) inkubiert. Vor der Messung wird über das Luminometer 60 µl Amplifier-Lösung (10 % Emerald Tropix, 0,2 M NaOH) zugegeben und die Aktivität schließlich bei 562 nm 5 Sekunden lang gemessen.

Die erhaltenen Messwerte werden gemittelt und mit Hilfe der Formel

$$\text{Luciferase-Wert} / \beta\text{-Galaktosidase-Wert} \times 1000 = \text{relativer Luciferase-Wert}$$
gegeneinander abgeglichen.

2.11.6 Proliferationsassay

Für die Bestimmung der Proliferation von adhärenenten Zellen werden diese mit einer Zellzahl von 5×10^3 und einem Gesamtvolumen von 200 µl in 96-Lochplatten ausgesät. Für jeden Messwert wird eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt und als Leerwert Medium pipettiert. Nach je 24 Stunden bzw. für den 0-Wert direkt nach dem Anheften der Zellen wird 50 µl/Loch XTT/PMS (PMS (0,383 mg/ml in PBS) 1:50 in XTT-Lösung (1 mg/ml in PBS) verdünnt) zu den Zellen gegeben. Nach drei Stunden wird das umgesetzte Substrat im Photometer bei 490 nm quantifiziert (Protokoll modifiziert nach Scudiero *et al.*, 1988).

2.11.7 Adhäsionsassay

Beim Adhäsionsassay werden in einem Volumen von 200 µl 5×10^4 bzw. 2×10^4 Zellen pro Loch in einer 96-Lochplatte ausgesät (vier Löcher für jeden Messwert). Die nicht angehefteten Zellen werden für den 0-Wert sofort, ansonsten nach der jeweiligen Zeit (fünf Minuten bis fünf Stunden), abgesaugt, das Loch einmal mit PBS gewaschen (200 µl) und 200 µl frisches Medium sowie 50 µl XTT/PMS-Lösung (siehe 2.11.6) pro Loch zugegeben. Nach drei Stunden wird die Absorption des umgesetzten Substrats bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch ermittelt.

2.11.8 Beschichten von Zellkulturschalen mit Kollagen

In jedes Loch der 96-Lochplatte werden 50 µl einer verdünnten Kollagen-Lösung (50 µg/ml in 0,02 M Essigsäure) pipettiert. Die Platte wird über Nacht (mind. 12 Stunden) offen in einer sterilen Werkbank belassen, so dass die Flüssigkeit vollkommen verdunsten kann.

Anschließend wird die Platte dreimal mit je 200 µl PBS/Loch gewaschen und direkt für den Adhäsionstest bzw. Proliferationstest eingesetzt.

2.11.9 Differenzierungsassay in 2d

Zur Differenzierung von HC11-Zellen auf Zellkulturschalen werden diese zunächst im Kulturmedium (siehe 2.3) ausgesät. Sobald sie konfluent sind, wird das Medium durch sog. „Hungermedium“ (Kulturmedium ohne EGF) ersetzt. Nach drei Tagen wird das Medium durch Induktionsmedium ersetzt (RPMI, 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, DIP= 10^{-6} M Dexamethason in Ethanol, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Prolaktin). Für eine β -Kasein-Untersuchung auf mRNA-Ebene sind zwei Tage Hormoninduktion ausreichend, bei Test auf Proteinexpression bedarf es mindestens drei Tage Induktion.

2.11.10 Differenzierungsassay im Kollagen-Gel

Primäre Brustepithelzellen benötigen eine geeignete extrazelluläre Matrix, um zu differenzieren. Für diese Arbeit wird Kollagen I isoliert aus Rattenschwanz (Becton Dickinson) verwendet. Der Test wird wie bei Imagawa (2000) beschrieben durchgeführt und ist im Folgenden noch einmal kurz beschrieben.

Zur Polymerisation wird das Kollagen auf eine Konzentration von 1,3 mg/ml mit 0,017 M Essigsäure verdünnt (alles auf Eis). Diese Menge ist gerade ausreichend, um das Kollagen zum Polymerisieren zu bringen. Eine zu hohe Konzentration führt zu einem zu festen Gel, in dem die Zellen nur noch schlecht oder gar nicht wachsen. Die Kälte und das saure Milieu verhindern die Polymerisation des Kollagens. Die verdünnte Kollagenlösung wird durch Zugabe von Neutralisierungslösung (10fach HBSS, 200 mM Hepes, 0,31 M NaOH) im Verhältnis von 15 Teilen Neutralisierungslösung und 85 Teilen Kollagenlösung neutralisiert. Nach 15-30 Minuten Inkubation bei 37° C im Brutschrank ist das Gel polymerisiert. Für ein Loch einer 12-Lochplatte werden 250 µl Kollagenlösung vorgelegt und anschließend weitere 250 µl Kollagenlösung mit 5×10^4 Zellen (das Volumen der Zellsuspension sollte 10 % der Kollagenlösung nicht überschreiten) auf die polymerisierte untere Schicht pipettiert. Nach Polymerisation der oberen Schicht werden in jedes Loch 1 ml Medium mit laktogenen Hormonen pipettiert. Das Medium wird alle 2-3 Tage durch frisches Medium mit laktogenen Hormonen ersetzt.

2.11.11 Isolierung von primären Brustepithelzellen

Die Isolierung von Epithelzellen aus dem Brustdrüsengewebe von Mäusen wird wie bei Imagawa (2000) beschrieben durchgeführt und wird hier kurz erläutert.

Die fünf Brustdrüsen der Maus sind auf der Innenseite der Haut als weiße Strukturen sichtbar, sie werden möglichst ohne anhängendes Fettgewebe so vollständig wie möglich entnommen und sofort in eiskaltes PBS gelegt. Sind alle Brustdrüsen entnommen, werden sie mit Hilfe einer Schere in ca. 2-3 mm große Stücke geschnitten. Zu F12/DMEM-Medium mit 1 mg/ml BSA und Penicillin/Streptomycin wird Kollagenase A (Endkonzentration 3 mg/ml; Roche, Basel) zugegeben und die zerkleinerten Brustdrüsen darin bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Nach etwa einer Stunde kann erstmals die Vollständigkeit des Verdaus überprüft werden. Die isolierten Organoiden sollten unter dem Lichtmikroskop glatt und frei von anhängendem mesenchymalem Gewebe sein. Ist der Verdau nach einer Stunde noch immer nicht vollständig, ist die erneute Zugabe von Kollagenase und eine weitere Inkubation für 30 Minuten nötig.

Die Organoiden werden anschließend 3-5 Minuten bei 100x g abzentrifugiert (eine höhere Zentrifugalkraft pelletiert auch die mesenchymalen Zellen, daher darf sie nicht zu hoch sein). Das oben schwimmende Fettgewebe wird abgenommen und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach einigen Waschschritten in F12/DMEM-Medium mit BSA zur Abtrennung der Kollagenase können die Organoiden direkt auf Zellkulturschalen ausgesetzt werden oder aber zur vollständigen Abtrennung der mesenchymalen Zellen über einen Dichtegradienten weiter aufgereinigt werden. Dazu wird das Pellet mit den Organoiden nach der Zentrifugation in einem Milliliter F12/DMEM ohne BSA resuspendiert und auf einen vorbereiteten Percoll™-Gradienten (siehe 2.11.11.1) gegeben. Es folgt eine Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei Raumtemperatur und 800x g.

Die einzelnen Schichten des Gradienten (siehe Abbildung 2.1) werden abgenommen und bis auf die Schicht mit den epithelialen Zellen (ca. 8-10 ml) verworfen.

Zum Abtrennen des Percolls™ müssen die Zellen anschließend dreimal auf 50 ml mit F12/DMEM + BSA aufgefüllt und fünf Minuten bei 150x g pelletiert werden. Danach können sie direkt in ein Kollagen-Gel gegeben werden oder auf Zellkulturschalen ausplattiert werden.

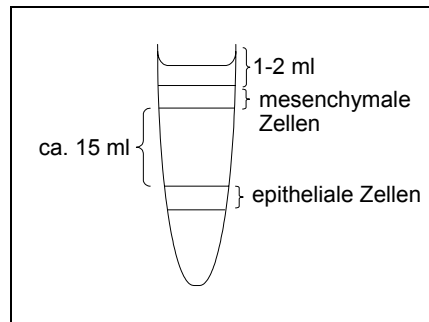


Abbildung 2.1 Dichtegradient zur Aufreinigung von Brustepithelzellen

2.11.11.1 Herstellung eines Percoll™-Gradienten

Percoll™ (Amersham) ist ein silikat-basierendes, kolloidales Medium für die Dichtegradientenzentrifugation. Für jeden Gradient werden 10,8 ml Percoll™ mit 1,2 ml 10x HBSS und 16 ml F12/DMEM gemischt (kräftig schütteln) und in 30 ml Zentrifugenröhrchen bei 20000x g und Raumtemperatur eine Stunde zentrifugiert. Dazu darf kein Ausschwingrotor verwendet werden. Die so vorbereiteten Gradienten sind bei 4° C einige Monate haltbar.

2.12 Proteinbiochemische Methoden

2.12.1 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgt mit dem Kit der Firma BioRad, welcher auf der Methode von Bradford basiert. Dabei wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

2.12.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht. Die Proben erhalten durch Zugabe eines 2x SDS Ladepuffers (187,5 mM Tris pH 6,8, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 15 % β -Mercaptoethanol) eine negative Ladung und wandern daher im elektrischen Feld der positiven Anode entgegen. Die Auftrennung erfolgt in Mini-Protean3-Gel-Apparaturen der Firma BioRad.

Die aufzutrennenden Proben werden im SDS-Ladepuffer fünf Minuten bei 95° C aufgekocht und in die Taschen des zwischen zwei Glasplatten befindlichen Gels aufgetragen.

Die Konzentration des benutzten Gels richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. In der Regel wird ein 4 %iges Sammelgel und ein 8-12 %iges Trenngel verwendet. Zum Fokussieren der Probe im Sammelgel wird eine Spannung von 100 Volt angelegt. Sind die Proben in das Trenngel eingewandert, kann diese auf bis zu 200 Volt erhöht werden.

2.12.3 Elektrotransfer

Für die Analyse der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden diese mittels Elektro-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu werden sechs Filterpapiere sowie eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll) auf die Größe des Gels geschnitten und in TransBlot-Puffer getränkt (5,82 g Tris, 2,93 g Glycin, 37,5 mg SDS, 200 ml Methanol ad 1L mit H₂O). Der Aufbau gleicht einem „Sandwich“ aus folgenden Lagen: drei feuchte Filterpapiere, darüber die Nitrocellulose-Membran, das ebenfalls in TransBlot getränkte Gel und drei weitere feuchte Filterpapiere. Der Transfer findet in der Halbtrockenkammer Transblot SD (BioRad) bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² Membranfläche für eine Stunde statt.

2.12.3.1 Ponceau-Färbung der Nitrocellulose-Membran

Zum Nachweis des erfolgreichen Blottens, sowie zur Überprüfung gleicher Proteinmengen in den einzelnen Spuren, wird die Membran einige Minuten in Ponceau-S-Lösung (0,5 % in 1 % Essigsäure) inkubiert. Zum Entfärben wird sie mehrmals kurz in 10 %iger Essigsäure gewaschen.

2.12.4 Immunchemischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper.

Alle Arbeitsschritte werden in NET-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5, 0,05 % Triton X-100) durchgeführt. Die freien Stellen auf der Membran, die nach dem Blotten die aufgetrennten Proteine enthält, werden durch 30-60 minütige Inkubation in NET-Gel (0,25 % Gelatine in NET) geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem Erst-Antikörper erfolgt in NET-Gel über Nacht bei 4° C. Nicht gebundener Antikörper wird durch dreimaliges Waschen (je 15 Minuten) in NET entfernt, bevor die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem ebenfalls in NET-Gel verdünnten, Peroxidase gekoppelten Zweit-Antikörper inkubiert wird.

Danach wird die Membran erneut dreimal 15 Minuten mit NET gewaschen. Die Detektion der Peroxidase-Aktivität erfolgt mit dem ECL-System der Firma Amersham und Nachweis der Lichtemission mit einem Röntgenfilm.

Bei Benutzung des β -Kasein-Antikörpers wurde statt NET TBS-T (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20) verwendet, zum Blocken statt NET-Gel 5% BSA in TBS-T.

Bei Verwendung des Phospho-Stat5-Antikörpers der Firma upstate wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen (Blocken und Erst-Antikörper in 5 % Milchpulver in TBS, Waschen mit Wasser, nach dem Zweit-Antikörper ein Waschschrift mit TBS-0,1 % Tween 20).

2.12.5 Entfernen von an der Membran gebundenen Antikörpern („Strippen“)

Das Strippen der Membran dient dazu, bereits gebundene Antikörper wieder zu entfernen, so dass ein Nachweis mit einem anderen Erst-Antikörper möglich ist. Dazu wird die Membran 20-30 Minuten bei 50° C im Strip-Puffer (65 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 50 μ M β -Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend muss diese erneut geblockt werden, bevor die nächste Inkubation mit dem Erst-Antikörper erfolgen kann.

2.12.6 Immunpräzipitation (IP)

Bei einer Immunpräzipitation (IP) kann ein Protein mit Hilfe eines Antikörpers aus einem Totallysat isoliert und im anschließenden Western Blot quantifiziert werden.

Dabei wird das Protein an einen spezifischen Antikörper gebunden, welcher wiederum über den Fc-Teil des Antikörpers an Protein-A bindet. Protein-A kann an Sepharose-Beads fixiert werden, wodurch die mit Protein beladenen Beads durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt werden können. Eine Abwandlung der IP stellt die Präzipitation mit Concanavalin A dar. Dieses kann ebenfalls an Sepharose-Beads gekoppelt werden. Concanavalin bindet glykosylierte Proteine, so dass man diese aus einem Totallysat anreichern kann.

Das Zellysat (in der Regel 0,5-1 mg Totalprotein) wird 1:2 mit HNTG-Puffer verdünnt (20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 10 % Glycerin) und mit 1 μ l des Antikörpers sowie 50 μ l Protein-A-Sepharose-Beads oder 25 μ l Concanavalin-Sepharose-Beads versetzt.

Die Bindung der Proteine erfolgt auf einem Drehrad für 2-4 Stunden bei 4° C. Anschließend werden die Beads 1 Minute bei 2000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mindestens dreimal mit 1 ml HNTG-Puffer gewaschen. Der SDS-Ladepuffer wird direkt zu den Beads gegeben. Durch fünf Minuten Inkubation bei 95° C werden die Proteine wieder von den Beads gelöst und schließlich auf einem SDS-Gel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion erfolgt im Western Blot (siehe 2.12.4).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Zielgene von DDR1 und DDR2

Der Signalweg Kollagen stimulierter DDR1- und DDR2-Rezeptoren ist weitgehend unbekannt. Gesichert ist, dass die Liganden-Bindung zu einer Transphosphorylierung der Rezeptoren führt (Vogel *et al.*, 1997). Die anschließende Signalkaskade und vor allem die Zielgene, deren Transkription daraufhin induziert wird, sind weitgehend unbekannt.

Mit der Einführung der Microarray-Technologie ist es möglich geworden, die Transkription einer großen Anzahl von Genen parallel zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode genutzt, um DDR1 oder DDR2 regulierte Zielgene zu identifizieren. Ziel dieses Vorhabens war es, einen möglichst generellen Überblick darüber zu bekommen, welche Gene in Abhängigkeit der aktivierten Rezeptoren angeschaltet bzw. reprimiert werden. Insbesondere wurden Matrix- und Matrix-assoziierte Gene untersucht.

3.1.1 Design des Microarray-Experiments

Zur Identifikation von DDR1 und DDR2 regulierter Gene sollten murine und humane Signalwege parallel untersucht werden. Dazu wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 und die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 ausgewählt. Die verwendeten Microarrays wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Memorec Stoffel in Köln entwickelt. Dazu wurden über 200 Matrix-, Matrix-assoziierte und Matrix-modifizierende Gene ausgewählt und 200-400 bp große Fragmente dieser Gene mittels PCR aus cDNA amplifiziert. Die cDNA wurde durch reverse Transkription aus RNA gewonnen, die aus verschiedenen Geweben von Mensch und Maus stammte. Die Auswahl der zu amplifizierenden Fragmente wurde jeweils so getroffen, dass eine Kreuzhybridisierung zu verwandten Genen bzw. zur jeweils anderen Spezies weitgehend ausgeschlossen ist.

Um Gene zu finden, die nach Aktivierung des Rezeptors jeweils verstärkt oder vermindert transkribiert werden, wurden Zellen, die DDR1 oder DDR2 heterolog überexprimieren, mit solchen verglichen, die den jeweiligen Rezeptor nicht, oder in nur sehr geringem Maße exprimieren. Beide Zellpopulationen wurden jeweils über Nacht mit Kollagen stimuliert.

Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da ein Vergleich von Kollagen behandelten (d.h. Rezeptor aktiviert) mit nicht behandelten Zellen auch Gene zeigen würde, deren Expression durch Kollagen, nicht aber zwangsweise durch Signale der DDRs reguliert wird.

3.1.1.1 Auswahl einer geeigneten Kontrolle

Bei der Durchführung eines Microarray-Experiments ist die Auswahl der optimalen Kontrolle von besonderer Bedeutung. Klonale Effekte müssen vermieden werden. Generell gilt, dass die Kontrolle sich von der Probe möglichst nur in der zu untersuchenden Größe unterscheiden sollte.

Daher wurde ein induzierbares System gewählt. Die Expression des transfizierten Rezeptors ist dabei durch die Zugabe von Doxycyclin reprimierbar, wodurch es möglich wird, den gleichen Zellklon sowohl für die Kontrolle (mit Doxycyclin) als auch für die Probe (ohne Doxycyclin, daher mit Rezeptor) zu verwenden. Um auszuschließen, dass die gefundenen Gene durch das Doxycyclin selbst beeinflusst werden, wurde je eine Kontrollzelllinie für NIH3T3 und HT1080 generiert, welche die Plasmide des induzierbaren Systems, nicht aber jene für DDR1 oder DDR2 besitzt.

Bei dem „Tet-off“-System steht die Transkription des Zielgens unter der Kontrolle des Minimalpromotors CMV_{min} (Gossen & Bujard, 1992). Eine von diesem Promotor vermittelte Transkription ist nur möglich, wenn ein Transaktivator an das „Tet-response element“ (TRE) des Promotors gebunden ist (siehe Abbildung 3.1). Bei Anwesenheit von Tetracyclin oder seinem Derivat Doxycyclin bindet dieses an den Transaktivator. Die Bindung verursacht eine Konformationsänderung, wodurch der Transaktivator vom TRE abfällt und die Transkription des folgenden Gens nicht mehr vermitteln kann. Die Expression des Transaktivators wird dabei von einem konstitutiven Promotor getrieben.

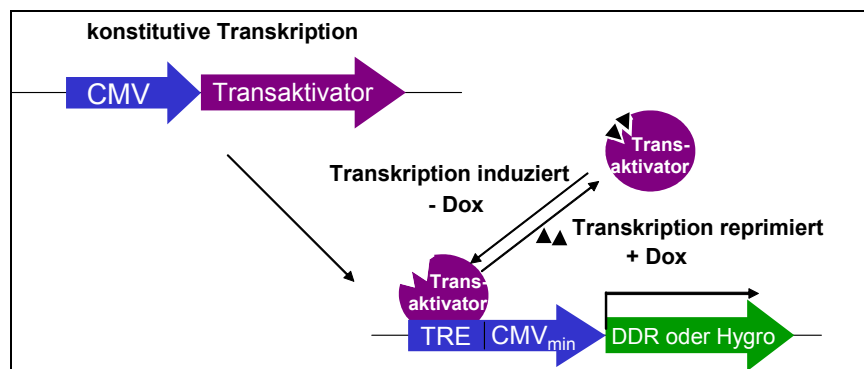


Abbildung 3.1 Das „Tet-off“ System. TRE: „Tet response element“.

3.1.2 Generierung von Zelllinien mit reprimierbarer DDR-Expression

Zur Generierung Doxycyclin reprimierbarer Zelllinien wurden in die murine Zelllinie NIH3T3 und in humane HT1080-Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode folgende drei Expressionsplasmide gleichzeitig transfiziert: Das Transaktivator-Plasmid pUHD-15, das Hygromycinresistenz-Plasmid pTBC1-Hygro und eines der Expressionsplasmide pTBC1-DDR1 oder pTBC1-DDR2. Die Zellen wurden anschließend zwei Wochen mit 125 µg/ml bzw. 175 µg/ml Hygromycin selektiert. Dabei wurde sich die Tatsache zu nutze gemacht, dass das transfizierte Hygromycin-Resistenzgen ebenfalls unter der Kontrolle des Minimal-Promotors steht, also eine Expression des Gens nur in Anwesenheit des Transaktivators stattfindet (Baasner *et al.*, 1996). Durch diesen Versuchsansatz war es möglich, mit Hilfe von Hygromycin gleichzeitig auf die Anwesenheit des Transaktivators und des Zielgens zu selektieren. Die Konzentration des eingesetzten Hygromycins wurde in Vorversuchen ermittelt. Dabei wurden nicht transfizierte NIH3T3- und HT1080-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Hygromycin behandelt. Zur Selektion wurde schließlich die niedrigste Konzentration gewählt, bei der gerade noch alle Zellen starben. Dies war für die NIH3T3-Zelllinie 125 µg/ml und für HT1080-Zellen 175 µg/ml Hygromycin.

Die folgende Anzahl an Klonen wurden nach zwei Wochen Selektion erhalten:

Transfizierte Plasmide	NIH3T3	HT1080
pUHD-15 (Transaktivator) pTBC1-DDR1b pTBC1-Hygro	21	18
pUHD-15 (Transaktivator) pTBC1-DDR2 pTBC1-Hygro	59	18
pUHD-15 (Transaktivator) pTBC1-DDR1b = Negativkontrolle	0	0
pUHD-15 (Transaktivator) pTBC1-Hygro = Positivkontrolle	>100	70

Tabelle 3.1 Erhaltene Anzahl von Klonen nach 14-tägiger Selektion mit Hygromycin

Für jede Zelllinie und jeden Rezeptor wurden mindestens 18 Klone gefunden. Die Negativ-Kontrolle zeigt, dass in der Tat nur solche Zellen die Selektion überleben, die mit dem Hygromycin-Expressionplasmid transfiziert wurden. Die höhere Anzahl der in der Positivkontrolle erhaltenen Klone liegt vermutlich daran, dass hierbei nur zwei statt drei Plasmide transfiziert wurden.

Etwa zehn Klone jeder Zelllinie und Rezeptor wurden expandiert und mit Hilfe eines DDR1- oder DDR2-Antikörpers im Western Blot auf ihre Rezeptor-Expression hin untersucht.

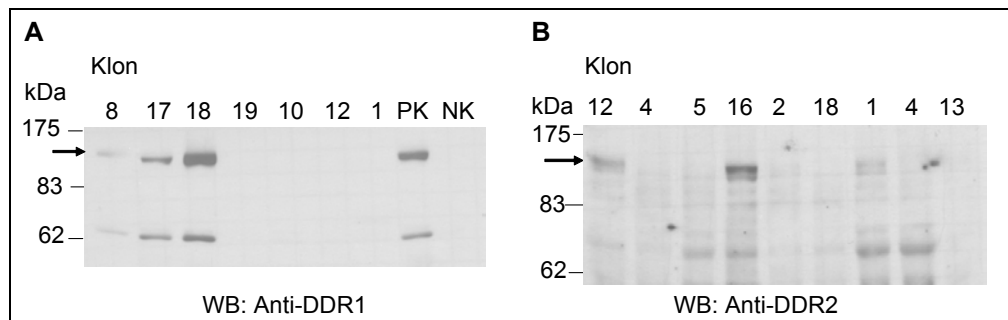


Abbildung 3.2 Etliche Klone exprimierten das stabil transfizierte DDR1 bzw. DDR2. Totallysate der mit DDR1 bzw. DDR2 stabil transfizierten NIH3T3-Klone wurden im Western Blot mit einem Anti-DDR1 (A) bzw. Anti-DDR2 (B) spezifischen Antikörper analysiert (PK= Positivkontrolle, NK= Negativkontrolle).

Wie in der Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.2 A) zu sehen, zeigte Klon Nummer K18 eine hohe DDR1-Expression. Ebenfalls positiv waren die Klone K8 und K17.

Bei der Untersuchung der mit DDR2 transfizierten NIH3T3-Zellen (Abbildung 3.2 B) wurden die Klone Nummer K12, K16 und K1 als DDR2 positiv identifiziert. Über die Höhe der Expression lassen sich keine präzisen Angaben machen, da die Proteinmengen auf dem SDS-Gel nicht normalisiert wurden. Zusammengekommen lässt sich feststellen, dass etwa ein Drittel aller getesteten Klone DDR1 bzw. DDR2 exprimierten.

Mit den HT1080-Klonen wurde ebenso verfahren. Hier wurden jeweils zwei bzw. drei Klone gefunden, die eine starke Expression des DDR1- oder DDR2-Rezeptors zeigten. Für HT1080DDR1 waren dies die Klone K12 und K13. Bei der Analyse der HT1080DDR2-Klone wurden Klon K6, K7 und K11 als positiv ermittelt.

Zellklone, die im Western Blot positiv für die Expression des Rezeptors waren, wurden anschließend auf ihre Induzierbarkeit mit Doxycyclin untersucht.

In allen Klonen, in denen eine Expression von DDR1 oder DDR2 zu sehen war, ließ sich diese durch die Zugabe von 5 µg/ml Doxycyclin unter die im Western Blot detektierbare Grenze reprimieren. In Abbildung 3.3 ist exemplarisch für zwei HT1080-Klone die Reprimierbarkeit im Western Blot gezeigt.

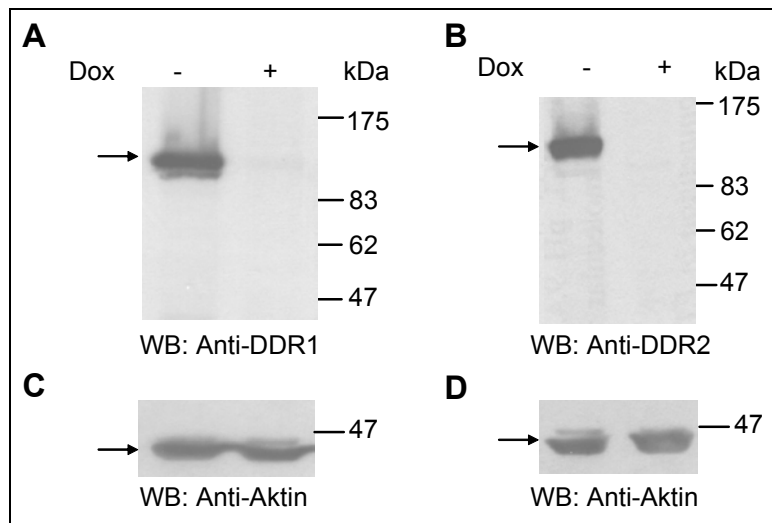


Abbildung 3.3 Die Expression von DDR1 bzw. DDR2 ließ sich durch Zugabe von Doxycyclin unter die detektierbare Grenze reprimieren. (A): HT1080DDR1-Klon 12 und **(B):** HT1080DDR2-Klon 6 wurden drei Tage mit 5 µg/ml Doxycyclin behandelt. Anschließend wurden die Totallysate im Western Blot mit einem Anti-DDR1- bzw. Anti-DDR2- Antikörper analysiert. **(C und D):** Als Ladungskontrolle wurden die Membranen gestrippt und mit einem Anti-Aktin-Antikörper inkubiert.

Wie in Abbildung 3.3 A und B zu sehen, war nach drei Tagen Inkubation mit 5 µg/ml Doxycyclin die heterologe Expression des Rezeptors vollständig reprimiert. Um zu zeigen, dass die Mengen an aufgetragenen Proteinlysaten nicht variierte, wurden die Antikörper von der Membran entfernt („Strippen“ siehe 2.12.5) und mit einem Anti-Aktin-Antikörper inkubiert.

In den beiden untersuchten Zelllinien wurde endogenes DDR im Vergleich zur heterologen Expression in so geringem Maße exprimiert, dass das Protein im Western Blot mit Totallysaten nicht detektierbar war.

Das Ergebnis dieser Western-Blot-Analyse zeigt, dass sich die DDR-Expression durch Doxycyclin sehr effektiv reprimieren ließ.

3.1.3 Kinetik der Repression

Bei der Analyse der Repression wurden die Zellen drei Tage mit Doxycyclin behandelt. Um zu erfahren, wie lange die Zellen mit Doxycyclin inkubiert werden müssen, um eine vollständige Repression zu erreichen und wie lange die Expression der Rezeptoren reprimiert werden kann, wurde ein Kinetik-Experiment durchgeführt. Dazu wurden NIH3T3DDR1-Zellen für unterschiedliche Zeit mit Doxycyclin behandelt und anschließend die DDR1-Expression im Western Blot untersucht.

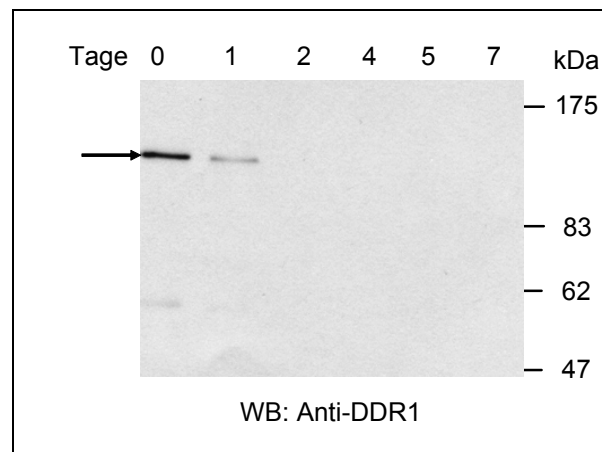


Abbildung 3.4 Die Expression von DDR1 war bereits nach zwei Tagen Doxycyclin-Behandlung nicht mehr zu detektieren. NIH3T3DDR1-K18-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 5 µg/ml Doxycyclin behandelt. Totallysate aus diesen Zellen wurden im Western Blot auf die Expression von DDR1 untersucht.

Die Zugabe von Doxycyclin führte bereits nach einem Tag zu einem starken Rückgang der DDR1-Expression (Abbildung 3.4). Nach zwei Tagen Doxycyclin-Inkubation war keine Expression mehr detektierbar. Für die anderen Klone bzw. die Kline der Zelllinie HT1080 wurden die gleichen Beobachtungen gemacht. In Kinetik-Experimenten konnte ferner gezeigt werden, dass für die gesamte untersuchte Zeit von 14 Tagen die heterologe Expression der Rezeptoren unterdrückt werden konnte. Die Wegnahme des Doxycyclins führte anschließend wieder zu einer Expression der Rezeptoren (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Differenzielle Genexpression in Doxycyclin behandelten Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression des Rezeptors innerhalb von zwei Tagen unter der Einwirkung von Doxycyclin verschwand, wurden für die Microarray-Experimente verschiedene, induzierbare Klone drei Tage mit Doxycyclin behandelt. Danach folgte eine über-Nacht-Stimulation der Zellen mit 10 µg/ml Kollagen I zur Aktivierung des DDR-Rezeptors. Am nächsten Tag wurde Total-RNA aus den Zellen isoliert. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde photometrisch ermittelt. 1 µg der RNA wurde in einem RNA-Gel aufgetrennt und der intakte Zustand der RNA anhand des Vorhandenseins der beiden rRNA-Banden überprüft.

Aus Total-RNA isolierte mRNA wurde in Anwesenheit von fluoreszenzmarkiertem dCTP in cDNA revers transkribiert. Dabei wurde jeweils die Probe, die aus DDR exprimierenden Zellen (d.h. ohne Doxycyclin) stammte, mit Cy5-dCTP und die mit Doxycyclin behandelte Probe (entspricht der Kontrolle, da kein DDR exprimiert wird) mit Cy3-dCTP markiert.

Die Proben wurden zur Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide aufgereinigt, Probe und Kontrolle kombiniert und auf einen mit cDNA bespotteten Microarray gegeben. Nach einer über-Nacht-Inkubation in einer feuchten Kammer bei 62° C und dem Auswaschen aller nicht hybridisierten cDNA Stränge wurde das Fluoreszenzsignal der gebundenen cDNA in einem Laserscanner gemessen.

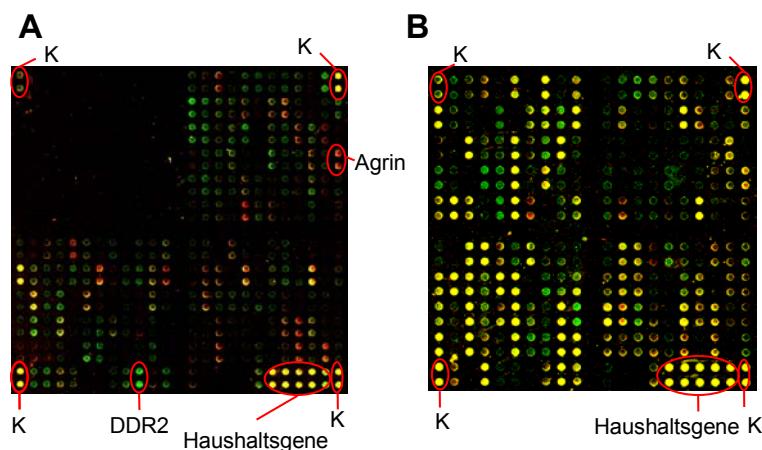


Abbildung 3.5 Repräsentative Abbildung eines (A) humanen und eines (B) murinen Microarrays. (A): Hybridisierung mit markierter cDNA aus HT1080DDR2-K6-Zellen und (B): NIH3T3DDR2-K12-Zellen mit (rot) und ohne (grün) Doxycyclin; K: Kontrolle. Grün steht für induzierte Gene, rot für reprimierte, gelb stellt nicht deregulierte Gene dar. Auf den linken oberen Quadrant in (A) wurde keine cDNA gespottet.

Die Abbildung 3.5 zeigt die übereinander gelagerten Bilder („Overlay“) aus den Messungen beider Kanäle (Cy3 und Cy5) eines humanen und eines murinen Arrays, der mit markierter cDNA aus dem HT1080DDR2-K6 (Abbildung 3.5 A) bzw. NIH3T3DDR2-K12 (Abbildung 3.5 B) hybridisiert wurde. Rote Signale repräsentieren dabei den Cy3-Kanal, also das Signal, das aus den mit Doxycyclin behandelten Zellen stammt (=Kontrolle, da ohne Doxycyclin), grüne Signale, stellen den Cy5-Kanal dar, also Hybridisierungen der cDNA, die aus den DDR exprimierenden Zellen stammt. In den Ecken finden sich synthetische *E.coli*-Transkripte, die vor bzw. nach der mRNA-Isolierung zugegeben werden. Sie erleichtern die Orientierung beim Scannen und dienen als interne Kontrolle während des Versuchsablaufs.

Das DDR2 ist in Abbildung 3.5 A markiert und deutlich als überexprimiertes Gen zu erkennen. Auf dem murinen Array war das DDR2 nicht zu sehen, da das transfizierte Plasmid humanes DDR2 enthält, welches nicht mit dem aufgespotteten murinen DDR2 kreuzhybridisiert. Für die weitere Versuchsdurchführung ist das nicht von Belang, da die beiden Genprodukte in hohem Maße homolog sind und sich die Unterschiede weitgehend auf den nicht-translatierten Bereich der cDNA beschränken. Aus diesem Bereich stammen die aufgespotteten Proben auf dem Array, was das Fehlen des DDR2-Spots in Abbildung 3.5 erklärt.

Das Einlesen der Arrays erfolgte bei der Firma Memorec in Köln. Dabei wurden die Signalintensitäten der einzelnen Spots wie unter 2.10.1.1 beschrieben ausgewertet.

Zusammenfassende Ergebnisse der HT1080 Microarray-Experimente

	HT1080DDR1	HT1080DDR2
AF6 (AF-6 Protein)	-2,5	-2,9
Aggrecan	--	2,4
Agrin	-4,0	-7,2
AT1 (α 1 Protease Inhibitor)	3,3	3,1
BPGF1 (bone derived growth factor 1)	-2,8	-3,2
DDR2	--	16,0
Fibrillin 1	3,6	--
Integrin β 7	3,0	2,9
Integrin β 8	2,5	--
Integrin α IIb	2,7	--
Integrin α 3 (CD49C)	-3,6	-3,3
Integrin α L	2,5	--
Kollagen α 1(XVIII)	-2,3	-2,3
Kollagen α 1(XVII)	2,5	--
Kollagen α 1(VIII)	2,8	3,25
Laminin α 2	2,8	2,3
Laminin α 4	2,4	--
LIMK1 (Lim domain kinase 1)	--	-2,9
MAGP2(Microfibril-associated glycoprotein 1)	2,6	2,9
Matrilin 2	2,7	2,4
Matrix GLA	2,6	2,8
MMP3 (Stromelysin-1)	3,1	2,8
MMP7 (Matrilysin)	3,1	2,9
MMP10 (Stromelysin-2)	2,9	--
PGS2 (Decorin)	2,4	2,3
PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand 1)	2,3	3,0
Ryodocan	-2,4	--
Syndecan-1	-2,9	-3,0
Tenascin-R	-2,9	--

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der in den HT1080 gefundenen, deregulierten Gene. Angegeben ist die x-fache Deregulation des Gens in DDR exprimierenden Zellen verglichen mit der Kontrolle (ohne DDR).

Eine zusammenfassende Auswahl der Gene, die in den Experimenten dereguliert gefunden wurden, ist in Tabelle 3.2 angelegt. Die Einzelwerte setzten sich aus bis zu vier unabhängigen Experimenten zusammen, bei der zum Teil neu präparierte RNA der betreffenden Zelllinie verwendet wurde, zum Teil aber auch ein Experiment mit derselben RNA-Präparation wiederholt wurde. Gene, die auch eine Deregulation in der Kontrollzelllinie zeigten (Zelllinie ohne DDR-Plasmid), sind nicht aufgeführt.

Auffallend war, dass eine Vielzahl gleicher Gene sowohl in den DDR1 als auch in den DDR2 überexprimierenden Zellen dereguliert war. Demgegenüber gab es aber auch Gene, die jeweils nur von einem Rezeptor reprimiert oder induziert wurden. Als Positivkontrolle war das am stärksten deregulierte Gen mit einer 16fachen Induktion das transfizierte DDR2-Gen. Die Deregulation von DDR1 war auf dem generierten Array nicht detektierbar, da die auf den Chip aufgespottete DDR1-cDNA aus einem Bereich im 3'UTR (untranslated region) des Gens stammt, welcher sich nicht in dem transfizierten Plasmid befand.

Als stärkstes dereguliertes endogenes Gen fand sich Agrin. Dieses Protein der ECM hemmt in neuronalen Zellen aus dem Hippocampus die Verlängerung der Axone (Mantych & Ferreira, 2001). Interessanterweise wurde auch für DDR eine Rolle bei der Axonverlängerung postuliert (Bhatt *et al.*, 2000). Hier zeigte sich, dass dominant negatives DDR1 ebenfalls die Verlängerung der Axone behindert. Es ist daher vorstellbar, dass Agrin ein direktes Zielgen von DDR1 ist und seine Expression unterdrückt werden muss, um eine korrekte Axon-Verlängerung zu gewährleisten.

Insgesamt waren 26 Gene in den HT1080DDR1- und 20 Gene in den HT1080DDR2-Zellen mehr als zweifach dereguliert (etwa 10 % der untersuchten Gene). Viele der deregulierten Gene fanden sich sowohl in DDR1 als auch in DDR2 exprimierenden Zellen. Dies zeigt, dass die beiden Tyrosinkinasen überlappende Funktionen haben.

Zusammenfassende Ergebnisse der NIH3T3 Microarray-Experimente

	NIH3T3DDR1	NIH3T3DDR2
Agrin	-5,4	-2,1
BMP2 (bone morphogenic protein 2)	--	2,4
BMP4 (bone morphogenic protein 4)	--	2,0
BMP5 (bone morphogenic protein 5)	5,0	2,6
BMP7 (bone morphogenic protein 7)	8,3	3,2
BPGF1 (bone derived growth factor 1)	--	-2,3
Fibrilin-2	3,2	2,4
GDF-5 (growth/differentiation factor 5)	--	2,4
Integrin α3 (CD49C)	-5,2	-2,2
Integrin β1 (CD29)	-2,0	--
Integrin β4 ITGB4 (CD104)	2,4	--
Integrin αL (CD11a)	--	3,6
Kollagen α1(XVIII)	2,8	--
Keratocan	2,8	--
LIMK-2 (Lim domain kinase)	--	2,2
Matrilin-1	5,6	2,9
MMP13 (Kollagenase 3)	2,6	--
MPP2 (MAGUK P55 subfamily member)	3,9	2,0
NCAML1 (neuronal cell adhesion molecule 1)	2,9	2,3
PDZK1 (PDZ containing protein)	3,5	2,6
PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand 1; CD162)	2,6	2,1
PGS2 (Decorin)	2,1	2,3
PPAR delta	-2,9	--
Syndecan-1	-4,4	--
Thrombospondin-5	3,1	--

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der in den NIH3T3 deregulierten Gene. Angegeben ist die x-fache Deregulation des Gens in DDR exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (ohne DDR).

Die Zusammenstellung der in den NIH3T3 gefundenen, deregulierten Gene zeigte wie schon in den humanen Zelllinien übereinstimmende Zielgene von DDR1 und DDR2. Ebenso ließen sich Gene finden, die lediglich von einem Rezeptor beeinflusst wurden. Insgesamt waren 20 Gene in DDR1 und 16 Gene in DDR2 exprimierenden NIH3T3-Zellen dereguliert. Das von DDR1 am höchsten induzierte Gen war BMP7 (bone morphogenic protein 7), DDR2 induzierte Integrin- α L am stärksten.

Gene, die von beiden DDRs sowohl in den HT1080 als auch in NIH3T3 dereguliert gefunden wurden, waren P-Selectin-Glykoprotein-Ligand (PSGL-1, auch als CD162 bezeichnet), das im Mittel 2,5fach induziert war, Agrin (4,7fach reprimiert) und α 3-Integrin (CD49C), das 3,6fach reprimiert war.

3.1.5 Clusteranalyse der in HT1080 deregulierten Gene

Die Expressionsdaten aus fünf unabhängigen Experimenten wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Memorec einer zweidimensionalen Clusteranalyse nach Eisen unterworfen (Eisen *et al.*, 1998). Diese Untersuchungsmethode ermöglichte es, Gene mit ähnlichem Expressionsprofil zu finden.

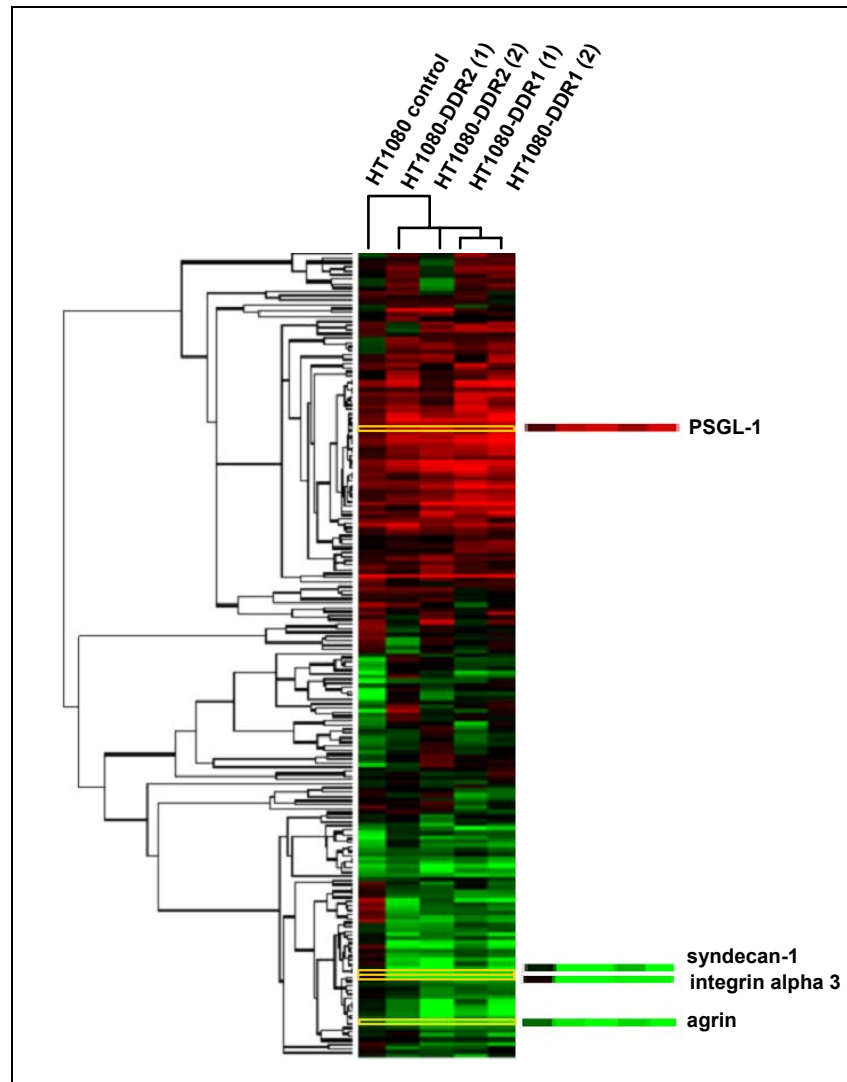


Abbildung 3.6 Clusteranalyse der HT1080-Daten nach Eisen (Eisen *et al.*, 1998). Die zweidimensionale Clusteranalyse zeigt die Expressionsdaten aus fünf Experimenten (HT1080-Kontrolle, HT1080DDR1 und HT1080DDR2). Grün stellt reprimierte, rot induzierte Gene dar, schwarz steht für unveränderte Genexpression. Die Ergebnisse für die deregulierten Gene PSGL-1, Syndecan-1, $\alpha 3$ -Integrin und Agrin sind hervorgehoben.

Die Analyse zeigte, dass die Gene Syndecan und Agrin nahe beieinander liegen, das bedeutet, dass sie ähnliche Expressionsmuster haben. An dem oberen Baumdiagramm lässt sich ferner ablesen, dass beim Vergleich der Expressionsprofile der beiden DDR1- bzw. DDR2-Zelllinien untereinander diese ähnlicher sind als beim Vergleich einer DDR1- mit einer DDR2-Zelllinie.

3.2 Analyse der Genexpression in der Brustdrüse der DDR1-Knock-out-Maus

Die Analyse der Genexpression sollte nun auf ein System ausgeweitet werden, das der tatsächlichen in-vivo Situation entspricht. Zudem sollte bei diesem Ansatz eine wesentlich größere Anzahl von Genen untersucht werden. Daher wurde auf die Arrays des Ontario Cancer Institutes (www.microarrays.ca) zurückgegriffen, auf deren Genchips 15.000 Gene als cDNA-Fragmente abgebildet sind. Die große Anzahl an Genen ermöglichte eine viel breitere Analyse der Genexpression in Abhängigkeit des DDR-Rezeptors. Im Gegensatz zu den mit der Firma Memorec entwickelten Arrays enthalten die Arrays des OCI auch eine Vielzahl nicht weiter charakterisierter ESTs („expressed sequence tags“). Von diesen Sequenzen ist lediglich bekannt, dass von ihnen eine mRNA transkribiert wird. Ob es sich dabei tatsächlich um Proteinkodierende Gene handelt, wie groß diese sind und welche Funktion sie haben könnten, ist unbekannt.

3.2.1 Design des Microarray-Experiments

DDR1-Knock-out-Mäuse sind aufgrund ungenügender Differenzierung der Brustdrüse nicht in der Lage, ihre Jungen zu säugen (siehe Abschnitt 1.5.6). Zur Identifizierung der Abläufe, die hierbei gestört sind, sollte daher die Genexpression von DDR1-Knock-out-Mäusen mit phänotypisch gesunden Mäusen mittels Microarray-Analyse verglichen werden. Da die höchste Expression von DDR1 in der Brustdrüse während der späten Schwangerschaft zu finden ist (Vogel *et al.*, 2000), wurde der Zeitpunkt 18,5 Tage nach der Befruchtung (E18,5) für die RNA-Isolierung gewählt.

Aus der Brustdrüse schwangerer DDR1(-/-)- und DDR1(+/-)-Mäuse wurde RNA isoliert, deren Qualität auf einem RNA-Gel überprüft und in Anwesenheit von Cy3- bzw. Cy5-dCTP in cDNA umgeschrieben wurde. Die Proben wurden vereinigt und gemeinsam auf einem 15.000 Gene enthaltenden Maus-spezifischen cDNA-Array hybridisiert. Bei jedem Experiment wurde zusätzlich ein sog. „Cy-flip“ durchgeführt. Dabei wurde jedes Experiment zweifach ausgeführt, wobei die Markierung mit Cy3 und Cy5 jeweils wechselseitig vertauscht wurde.

Die Arrays wurden mit dem GenePix4000A (Axon Instruments, USA) Laser-scanner eingelesen und mit der zugehörigen Geräte-Software ausgewertet.

3.2.2 Differenziell regulierte Gene in der Brustdrüse der DDR1-Knock-out-Maus

Insgesamt wurden für diesen Versuchsansatz vier Arrays mit RNA aus der Brustdrüse von schwangeren heterozygoten und Knock-out-Mäusen hybridisiert. Die erhaltenen Werte wurden wie beschrieben gefiltert (siehe 2.10.2.1). Die folgende Tabelle enthält eine Auswahl von Genen, die in den hybridisierten Arrays eine mindestens 1,5fache Deregulation zeigten. Es wurden etwa 80 Gene gefunden, deren Deregulation auf der Mehrzahl der hybridisierten Arrays beobachtet werden konnte. Dabei gingen nur solche Gene bzw. EST mit in die Statistik ein, die eine eindeutige Annotation besitzen. Die Auswahl der gezeigten Gene richtete sich nach der Höhe der Deregulation sowie der Häufigkeit ihres Auftretens.

Unigene Name	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Mittelwert	Standard-abweichung
Mm.27934	1,85	1,51	1,53	1,93	1,71	0,19
Mm.27182	1,46	2,55	1,76	1,61	1,84	0,42
Mm.100060	1,62	1,58	1,51	1,51	1,55	0,05
Mm.86541	1,96	1,88	1,80	2,06	1,93	0,10
Mm.31073	1,47	1,68	1,65	1,61	1,60	0,08
Mm.155530	1,59	1,46	1,71	1,52	1,57	0,09
Mm.26336	1,72	1,92	1,51	1,70	1,71	0,15
Mm.26344	1,45	1,53	1,62	1,53	1,54	0,06
Mm.104653	1,65	1,55	2,17	1,47	1,71	0,27
Mm.12925	1,93	1,67	1,66	1,44	1,68	0,17
Mm.578	1,90	2,74	2,68	1,81	2,28	0,43
Mm.9537	-2,49	-2,05	-1,73	-1,64	-1,98	0,33
Mm.1650	-1,81	-2,08	-1,58	-2,42	-1,97	0,31
Mm.21172	-7,06	-8,07	-5,25	-7,90	-7,07	1,12
Mm.103222	-1,68	-1,87	-1,89	-1,70	-1,79	0,09
Mm.6635	-1,81	-2,17	-1,96	-1,77	-1,93	0,16
Mm.22482	-2,03	-1,68	-1,57	-2,03	-1,83	0,20
Mm.7156	-2,14	-2,28	-1,79	-2,25	-2,12	0,19
Mm.29835	-2,04	-1,67	-1,77	-2,03	-1,88	0,16
Mm.1479	-2,88	-1,86	-2,61	-2,32	-2,42	0,38
Mm.27953	-2,84	-1,94	-1,88	-2,20	-2,21	0,38
Mm.22482	-2,05	-1,85	-1,99	-2,01	-1,98	0,08
Mm.22220	-2,15	-1,76	-1,77	-2,76	-2,11	0,40
Mm.143722	-2,95	-2,29	-1,80	-2,90	-2,48	0,47
Mm.321	-3,05	-2,06	-1,74	-2,76	-2,40	0,52

Tabelle 3.4 Auswahl der in DDR1(-/-) gefundenen, deregulierten Gene. Es ist die x-fache Deregulation des Gens in der DDR1-Knock-out-Maus im Vergleich zur heterozygoten Maus angegeben. Die Bezeichnung der Gene sind UNIGENE Annotationen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene>).

Das in der DDR1(-/-)-Brustdrüse am stärksten induzierte Gen war IGFBP-5 (Insulin-like growth factor binding protein 5, Mm.578) mit durchschnittlich 2,3facher Induktion. Die Expression von IGFBP-5 ist normalerweise während der Involution der Brustdrüse erhöht (Tonner *et al.*, 2002). Es unterdrückt den Effekt von IGFI, indem es die Interaktion mit dem IGF-Rezeptor behindert und damit den Apoptose-schützenden Effekt von IGF aufhebt (Marshman *et al.*, 2003).

Das am stärksten reprimierte Gen war mit siebenfacher Deregulation das „salivary protein“ (Mm.21172, Speichelprotein). Danach folgen Mm.147322 (Tuftelin interagierendes Protein) und Osteopontin (Mm.321) mit jeweils etwa 2,4facher Repression. Die Bedeutung dieser Gene im Zusammenhang mit DDR1 wird in 4.2.3 ausführlich diskutiert.

3.2.3 Real-time-Experimente zur Bestätigung der putativen Zielgene von DDR1

Die quantitative PCR, auch Real-time-PCR genannt, ermöglicht es, die Menge an synthetisierter DNA während einer PCR zu verfolgen. Da die Amplifikation der DNA während einer PCR, die bekanntlich logarithmisch erfolgt, proportional zur Ausgangsmenge ist, kann man mit dieser Methode DNA-Mengen spezifisch für eine ausgewählte Sequenz quantifizieren. Die Kombination von Real-time-PCR und reverser Transkription ermöglicht es ferner, die Menge an transkribierter RNA eines Genes zu bestimmen (Bustin, 2000).

Die mit den Arrays erhaltenen Ergebnisse wurden mit der Real-time-PCR Methode verifiziert. Die Kriterien, nach welchen die weiter untersuchten Gene ausgewählt wurden, sind in 4.2.1 näher erläutert. RNA aus den Brustdrüsen schwangerer (E18,5) heterozygoter bzw. Knock-out-Mäuse wurde isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Es wurden für jedes zu untersuchende Gen genspezifische Primer generiert, welche ein etwa 100 bp großes Fragment amplifizieren und die Expressionshöhe der Gene in einer Real-time-PCR mit Hilfe von SYBR-Green quantifizieren. Damit konnten für den überwiegenden Teil der Gene die aus dem Array-Experiment ermittelten Werte bestätigt werden.

In Abbildung 3.7 ist exemplarisch das Ergebnis eines Real-time-Experiments für das IGFBP-5-Gen gezeigt. Die Zyklusnummer, bei der die detektierte DNA-Menge der Probe den Schwellenwert erreichte (Ct-Wert, „threshold cycle“), war für die cDNA aus der Knock-out-Maus bei diesem Experiment etwa 1,4 Zyklen kleiner als für die Probe, die aus der heterozygoten Maus stammte, was einer 2,6fachen ($2^{\Delta Ct}$) Induktion von IGFBP-5 in der DDR1-Knock-out-Maus entsprach (der in Tabelle 3.5 enthaltene Wert für IGFBP-5 ist ein Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten). Dieser Wert stimmte gut mit dem aus den Microarray-Experimenten erhaltenen Wert von 2,3 überein.

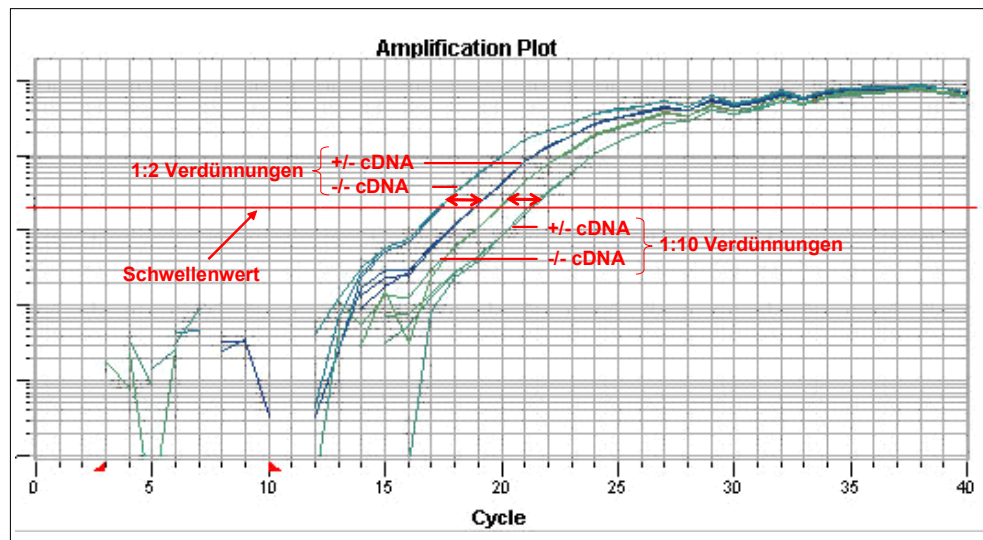


Abbildung 3.7 Repräsentative Darstellung eines Real-time-Experiments (IGFBP-5). Die Grafik zeigt einen IGFBP-5-Amplifikations-plot zweier cDNA-Verdünnungen (1:2 und 1:10) präpariert aus den Brustdrüsen einer schwangeren (E18,5) DDR1(-/-) bzw. DDR1(+/-)-Maus (dreifach-Bestimmung). Die roten Pfeile kennzeichnen den Unterschied zwischen den beiden cDNAs. Der Ct-Wert (threshold cycle) bezeichnet die Anzahl der Zyklen, die eine Probe benötigt, um den Schwellenwert zu erreichen.

In der Tabelle 3.5 sind die Real-time-Ergebnisse der untersuchten Gene zusammengefasst. Dabei bedeutet ein negativer Wert, dass in der Knock-out-Maus verglichen mit der heterozygoten Maus das Gen weniger stark transkribiert wurde, also die Transkription durch die Abwesenheit von DDR1 reprimiert war, während ein positiver Wert eine Induktion der Transkription in der Knock-out-Maus bedeutet.

Gen	ΔCt -Wert	Deregulation aus Real-time-PCR	Deregulation aus Array-Exp.
Mm 21172 („salivary protein“)	-7,5	-181	-7,1
Mm 27953 (Glycin-Decarboxylase)	-2	-4	-2,1
Mm 22220 (MDGI)	-1,2	-2,3	-2,1
Mm 321 (Osteopontin)	-1,1	-2,2	-2,4
Mm 9537 (N-Gal)	-0,7	-1,6	-2
Mm 1650 (WDNMI)	-0,4	-1,3	-2
Mm 143722 (Tuftelin interagierendes Protein)	-0,01	-1,01	-2,5
Mm 86541 (nocturin)	1,1	2,2	1,9
Mm 578 (IGFBP-5)	1,1	2,2	2,3

Tabelle 3.5 Zusammenfassung der Real-time-Experimente. Die Werte geben jeweils den Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten wieder. Negative ΔCt -Werte entsprechen einer Repression des Gens in der Knock-out-Brustdrüse, positive eine Hochregulation.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Daten der Microarrays sich mit der Real-time-PCR bestätigen ließen. Lediglich für das Gen Mm.143722 (Tuftelin interagierendes Protein) konnte keine Deregulation mit der Real-time-PCR gefunden werden. Die Unterschiede der Deregulation in der Real-time-PCR verglichen mit dem Microarray-Experiment wichen zwar in wenigen Fällen relativ stark voneinander ab („salivary protein“ und Glycin Decarboxylase), aber die Tendenz der Deregulation war mit einer Ausnahme mit dem Ergebnis aus den Microarray-Experimenten vergleichbar. Für alle anderen Gene konnte das Ergebnis aus der Microarray-Analyse bestätigt werden. Dennoch muss in weiteren Experimenten noch gezeigt werden, dass der Unterschied im mRNA-Gehalt sich tatsächlich auch in der Höhe der Proteinexpression widerspiegelt. Da die gefundenen Gene (z. B. Osteopontin oder IGFBP-5) in der Brustdrüse reguliert sind, d.h. ihre Expression während Pubertät, Schwangerschaft, Laktation und Involution unterschiedlich ist, musste ein System gefunden werden, das diese Stadien in-vitro nachahmt. Damit wäre es möglich, den Zusammenhang zwischen den gefundenen Gene und DDR1 funktionell zu analysieren.

3.3 Analyse der Rolle von DDR1 in nicht-transformierten Brustepithelzellen

Um die Rolle von DDR1 in einem in-vitro System untersuchen zu können, wurde eine Brustepithelzelllinie benötigt, die sich in-vitro differenzieren lässt. Diese Zellen sollten einen Phänotyp haben, der dem von Brustepithelzellen in-vivo während einer Schwangerschaft und der Laktation nahe kommt. Dieses gilt für einige nicht transformierte Zelllinien wie zum Beispiel der murinen Brustepithelzelllinie HC11. Diese Zellen lassen sich durch die Zugabe von laktogenen Hormonen differenzieren, was man unter anderem durch die Expression von β -Kasein nachweisen kann (Ball *et al.*, 1988). Für die nachfolgenden Experimente wurde daher die Funktion von DDR1 in HC11-Zellen untersucht.

3.3.1 DDR1-Rezeptorstatus in HC11-Zellen

Zur Charakterisierung der murinen Brustepithelzelllinie HC11 wurde zunächst der DDR1-Rezeptorstatus dieser Zelllinie untersucht. Da die Expression von DDR1 in humanen Brustkarzinomzelllinien sehr stark variiert (Alves *et al.*, 1995), wurde die Methode der Immunpräzipitation gewählt, um eventuell vorhandenes DDR1 nachzuweisen.

Dazu wurden HC11-Zellen über Nacht mit Kollagen stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und mit einem Anti-DDR1-Antikörper oder mit Concanavalin-A-Sepharose präzipitiert. Concanavalin-A bindet an glykosylierte Proteine (wie z. B. DDR1 und 2), während der für die IP verwendete Anti-DDR1-Antikörper das alternativ gesplicete Exon 11 erkennt, welches in DDR1a nicht vorhanden ist. Die anschließende Western-Blot-Analyse erfolgte mit einem DDR1-Antikörper, welcher die Isoformen a, b und c erkennt.

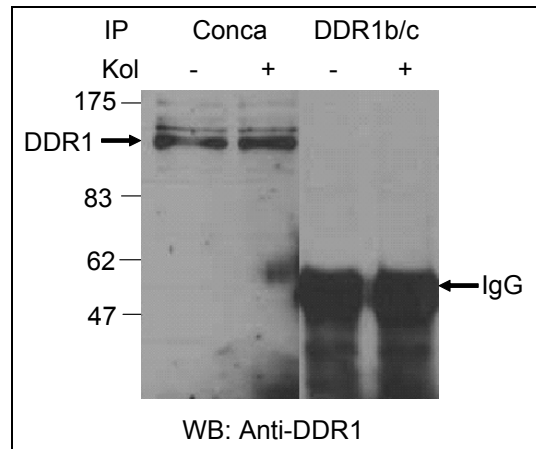


Abbildung 3.8 HC11-Zellen exprimierten DDR1a, nicht aber DDR1b und 1c. Zelllysate von Kollagen stimulierten bzw. nicht stimulierten HC11-Zellen wurde mit Concanavalin-A oder einem Anti-DDR1-Antikörper (spezifischen für Exon 11) (immun)präzipitiert und anschließend im Western Blot mit einem Anti-DDR1-Antikörper untersucht.

Mit Hilfe von Concanavalin, welches alle DDR1-Isoformen präzipitiert und dem folgenden Western Blot mit einem Anti-DDR1-Antikörper, der DDR1a, b und c erkennt, konnte die Expression von DDR1 in HC11-Zellen gezeigt werden. In den Spuren eins und zwei (Abbildung 3.8) war jeweils eine Bande bei etwa 130 kDa zu sehen. Da bei Benutzung des Antikörpers, welcher DDR1b und DDR1c erkennt, kein DDR1 aus dem HC11-Zelllysate präzipitiert werden konnte (Abbildung 3.8, Spuren 3 und 4), musste es sich bei dem mit Concanavalin präzipitierten Protein um DDR1a handeln. Die Präzipitation mit dem spezifischen Antikörper wurde wiederholt, und es wurde bestätigt, dass DDR1b und 1c nicht nachweisbar sind.

Das Experiment der Immunopräzipitation zeigte, dass DDR1b und DDR1c in HC11-Zellen nicht exprimiert wurden, während DDR1a in signifikanter Menge exprimiert wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von DDR1a nach Aktivierung des Rezeptors mit Kollagen unverändert bleibt (vergleiche Spur 1 mit 2).

3.3.2 Infektion von HC11-Zellen mit DDR1

Um den Einfluss von DDR1 auf Brustepithelzellen zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt HC11-Zellen mit DDR1 transduziert. Dazu wurden HC11-Zellen mit Virusüberstand überinfiziert. Dieses stammte aus der Verpackungszelllinie GPE, die mit dem retroviralen Plasmid pLXSN-DDR1b-Flag transfiziert worden war. Anschließend wurden die HC11-Zellen fünf Tage mit G418 selektiert. Nach diesem Zeitpunkt waren in den Mock-transduzierten Zellen keine Überlebenden zu finden, während der überwiegende Teil der DDR1 transduzierten Zellen G418 resistent war. Die Expression von DDR1 wurde anschließend in der Western-Blot-Analyse getestet.

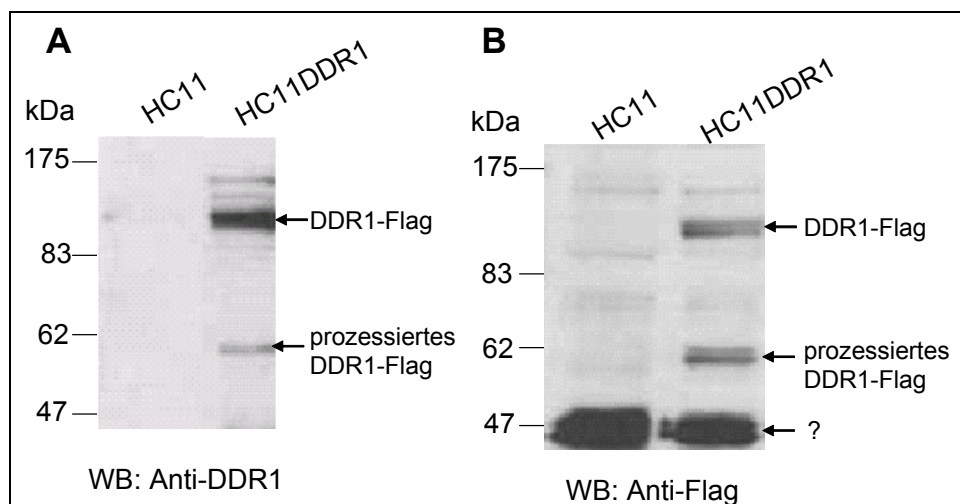


Abbildung 3.9 In infizierten HC11-Zellen ließ sich die Expression von DDR1 mit einem Anti-DDR1 (A) sowie einem Anti-Flag-Antikörper (B) detektieren. Zelllysate von parentalen und infizierten Zellen wurden in einem Western Blot mit einem Anti-DDR1- und einem Anti-Flag-Antikörper analysiert.

Totallysate von DDR1 transduzierten und parentalen HC11-Zellen wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit Hilfe eines Anti-DDR1- (Abbildung 3.9 A) bzw. Anti-Flag-Antikörpers (Abbildung 3.9 B) die Expression von DDR1 überprüft. Das DDR1 konnte als eine ca. 125 kDa große Bande sowohl mit dem Anti-Flag-Antikörper als auch mit dem Anti-DDR1-Antikörper detektiert werden. Ebenso war das prozessierte DDR1-Fragment zu sehen (ca. 60 kDa). Bei der 45 kDa großen Bande in Abbildung 3.9 B handelte es sich wahrscheinlich um ein unspezifisches Kreuzhybridisierungs-Produkt des Flag Antikörpers.

Im Vergleich zur Western Blot Analyse der parentalen Zellen in Abbildung 3.8, der eine Immunpräzipitation vorausgegangen war, wurde bei diesem Ansatz eine etwa 25fach geringere Menge Lysat aufgetragen. Das bedeutet, die Menge an heterolog exprimiertem DDR1 war im Vergleich zu dem endogen exprimierten DDR1 um diesen Faktor höher. Nach der erfolgreichen Transduktion der HC11-Zellen war das phänotypische Erscheinungsbild der HC11DDR1-Zellen lichtmikroskopisch nicht von dem parentalen zu unterscheiden.

3.4 Vergleichende Charakterisierung von HC11- und HC11DDR1-Zellen

Nachdem mit den DDR1 überexprimierenden HC11-Zellen ein Werkzeug zur Verfügung stand, mit dessen Hilfe man den Einfluss von DDR1 auf das Wachstum und die Differenzierung von Brustepithelzellen untersuchen kann, wurden die Zellen auf verschiedene Parameter hin getestet. Als erstes wurde überprüft, ob DDR1 einen Einfluss auf die Differenzierung von Brustepithelzellen im 3D-Kollagen-Gel hat.

3.4.1 Verhalten von HC11-/HC11DDR1-Zellen in 3D-Kollagen-Kulturen

HC11-Zellen sind in der Lage, in-vitro zu differenzieren. Bettet man sie in eine dreidimensionale Matrix ein und behandelt sie mit laktogenen Hormonen, bilden sie Strukturen, die Schritte der In-vivo-Organogenese nachvollziehen. Durch die Formung eines Lumens sind sie in der Lage, schlauch- und ballartige Formen zu bilden, die Milchgängen und Alveolen in der Brustdrüse gleichen.

Als Matrix eignen sich entweder eine Basalmembran-Matrix, wie z. B. Matrigel™, oder Kollagen I. Matrigel™ ist ein Gemisch extrazellulärer Proteine, das aus einem ECM-reichen Engelbert-Holm-Maus-Sarkom isoliert wurde (Liotta, 1982). Es enthält hauptsächlich Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat-Proteoglykane. Kollagen I kann aus verschiedenen bindegewebsreichen Organen wie z. B. der Haut isoliert werden. Für die vorliegende Arbeit wurde aus Rattenschwänzen isoliertes Kollagen I (BD Bioscience) verwendet, da zum einen die Effekte leichter zu analysieren sind, wenn sie von einer definierten Matrix ausgehen und zum anderen durch das Kollagen I gewährleistet ist, dass DDR1 im aktivierten Zustand vorliegt, was eine Voraussetzung dafür ist, die Wirkungsweise des Rezeptors zu untersuchen.

HC11- und HC11DDR1-Zellen wurden wie unter 2.11.10 beschrieben in ein Kollagen-Gel gegossen. Das Medium der Zellen wurde alle drei Tage durch frisches ersetzt, in dem sich auch stets frische laktogene Hormone befanden.

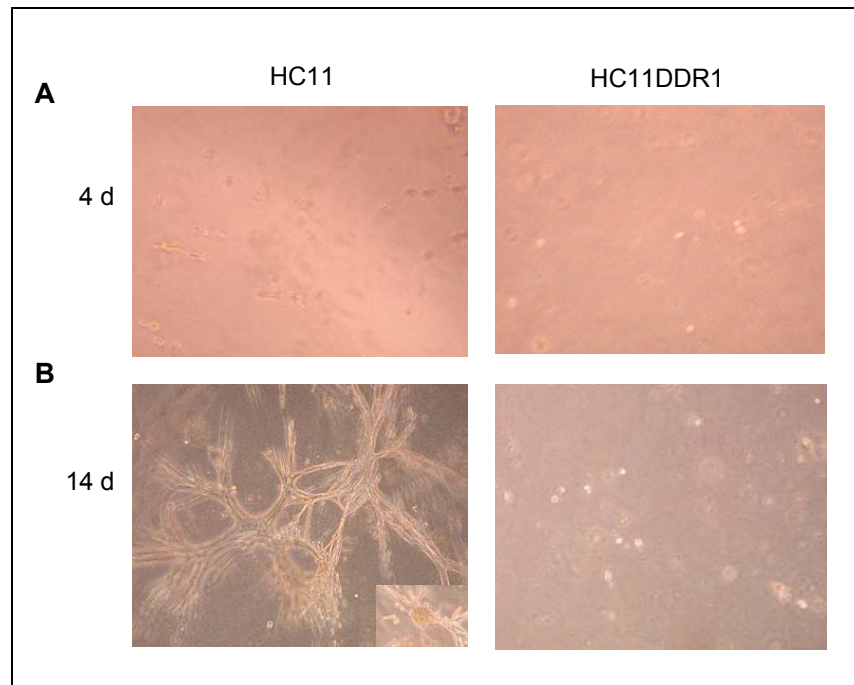
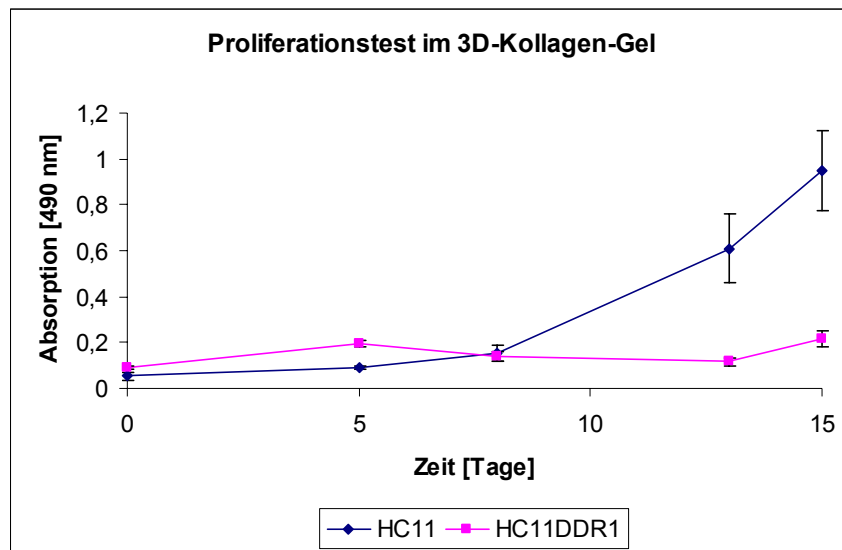


Abbildung 3.10 HC11DDR1-Zellen wuchsen nicht im 3D-Kollagen-Gel. 5×10^4 HC11- und HC11DDR1-Zellen pro Loch (12-Lochplatte) wurden in ein Kollagen gebettet und mit laktogenen Hormonen enthaltendem Medium überschichtet. **(A)** Zellen nach vier bzw. **(B)** 14 Tagen im Kollagen-Gel.

HC11-Wildtyp-Zellen formten im Gel dreidimensionale Strukturen, die an die Milchgänge in der Brustdrüse erinnern. Ebenso ließen sich sphärische Strukturen finden (siehe links Kasten in Abbildung 3.10 B), wie sie für Brustepithelzellen, welche sich in einer dreidimensionalen Matrix befinden, bereits beschrieben wurden (Jonsson & Andersson, 2001). Überraschenderweise wurde die morphologische Differenzierung im 3D-Kollagen-Gel durch die Überexpression von DDR1 weitgehend unterdrückt. HC11DDR1-Zellen proliferierten im Kollagen-Gel nicht und bildeten keine charakteristischen Gänge, wie man sie in den Wildtyp-Zellen sehen konnte. Das bedeutet, die Überexpression von DDR1 verhinderte, dass HC11-Zellen im 3D-Kollagen-Gel wuchsen und differenzierten. Daher wurde im Folgenden untersucht, inwieweit die Überexpression von DDR1 die Proliferation, die Differenzierung sowie die Adhäsion von HC11-Zellen beeinflusst.

3.4.2 Proliferation von HC11/HC11DDR1-Zellen im Kollagen-Gel

Da HC11DDR1-Zellen im Kollagen-Gel kein oder kaum Wachstum zeigten, wurde zunächst in einem weiteren 3D-Gel-Experiment die Proliferation der HC11- und HC11DDR1-Zellen im Kollagen-Gel quantifiziert. Dazu wurden die Zellen in einer 96-Lochplatte in Kollagen-Gel gegeben und ihr Wachstum unter normalen Zellkulturbedingungen über 15 Tage mit Hilfe des XTT-Tests gemessen. Beim XTT-Test wird die Lebendzellzahl eines Versuchsansatzes durch photometrische Messung der Dehydrogenase-Aktivität ermittelt.



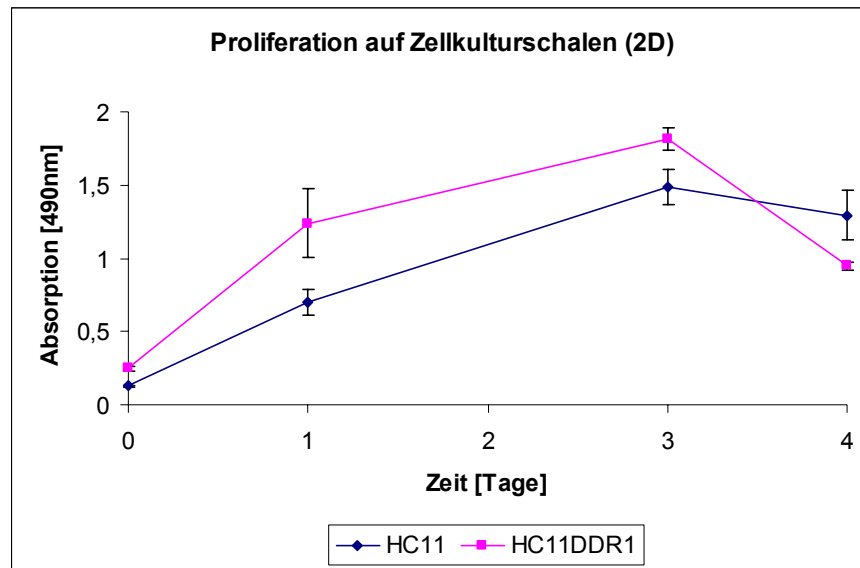
Grafik 3.1 HC11DDR1-Zellen proliferieren nicht im 3D-Kollagen-Gel. In einer 96-Lochplatte wurden 1×10^3 Zellen in einem Kollagen-Gel ausgesät (Vierfach-Bestimmung). Die Lebendzellzahl der HC11- und HC11DDR1-Zellen wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen durch Messung der metabolischen Aktivität ermittelt (XTT-Test).

Wie in Grafik 3.1 zu sehen, zeigten die HC11DDR1-Zellen in der ersten Woche gleiches Wachstumsverhalten wie auch die HC11-Zellen. Hierbei handelte es sich um eine minimale Zunahme der Lebendzellzahl. Nach acht Tagen begannen die HC11-Zellen, kräftig zu proliferieren. Dieses Wachstum stoppte erst, nachdem das Gel vollkommen vom Zellgeflecht durchzogen war.

Das Ergebnis dieses Versuchs warf die Frage auf, ob HC11-Zellen durch die Überexpression von DDR1 grundsätzlich im Wachstum gehemmt waren oder ob der beobachtete Effekt spezifisch für das 3D-Kollagen-Milieu war. Außerdem stellte sich die Frage, inwieweit sich die Auswirkungen von Differenzierung und Proliferation überlagerten.

3.4.3 Proliferation von HC11-/HC11DDR1-Zellen

Um Klarheit über den Effekt von DDR1 auf die Proliferation von HC11-Zellen zu bekommen, wurde die Proliferation der Zellen in der 2D-Kultur (unbehandelte Zellkulturschalen) gemessen. Dazu wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl auf 96-Lochplatten ausgesät und ihr Wachstum mit Hilfe eines XTT-Tests über vier Tage hin untersucht.

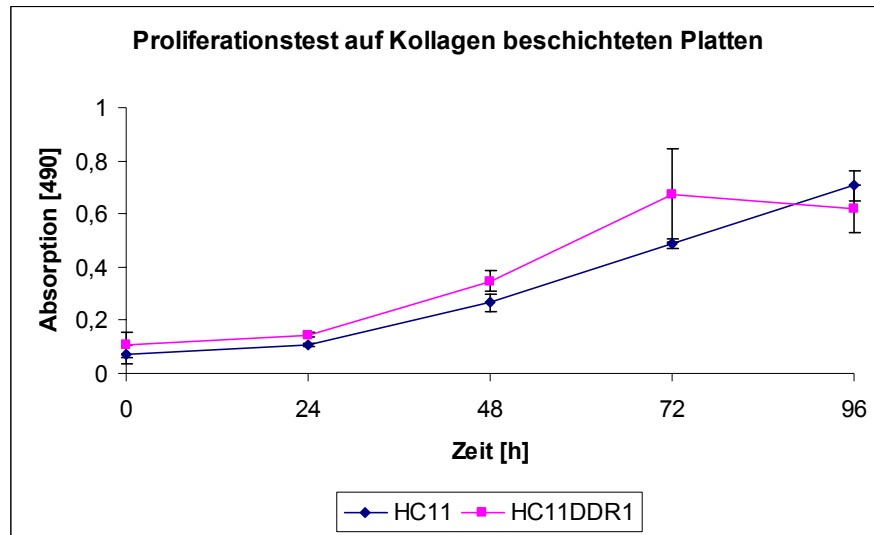


Grafik 3.2 HC11- und HC11DDR1-Zellen wuchsen mit vergleichbaren Kinetiken auf Zellkulturschalen. In einer 96-Lochplatte (Vierfach-Bestimmung) wurden 5×10^3 Zellen pro Loch ausgesät und zu den angegebenen Zeiten mit Hilfe des XTT-Tests die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt.

Wie anhand der Grafik 3.2 zu erkennen ist, war die Proliferationsrate von HC11- und HC11DDR1-Zellen vergleichbar. Die Differenz, die auf der Grafik zu sehen ist, lässt sich durch die leicht erhöhte Ausgangszellzahl der HC11DDR1-Zellen erklären (siehe 0-Wert). Dieses Experiment wurde zweimal mit gleichem Ergebnis wiederholt, wobei auch niedrigere Zellzahlen verwendet wurden. Die Expression von DDR1 hatte keinen generell hemmenden Effekt auf das 2D-Zellwachstum von HC11-Zellen.

3.4.4 Proliferation auf Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen

Um die Frage zu klären, ob die ausbleibende Proliferation der HC11DDR1-Zellen im 3D-Kollagen-Gel auf das Kollagen und die damit verbundene Aktivierung des Rezeptors zurückzuführen ist, wurde der 2D-Proliferationstest auf Zellkulturplatten wiederholt, die mit Kollagen beschichtet worden waren.



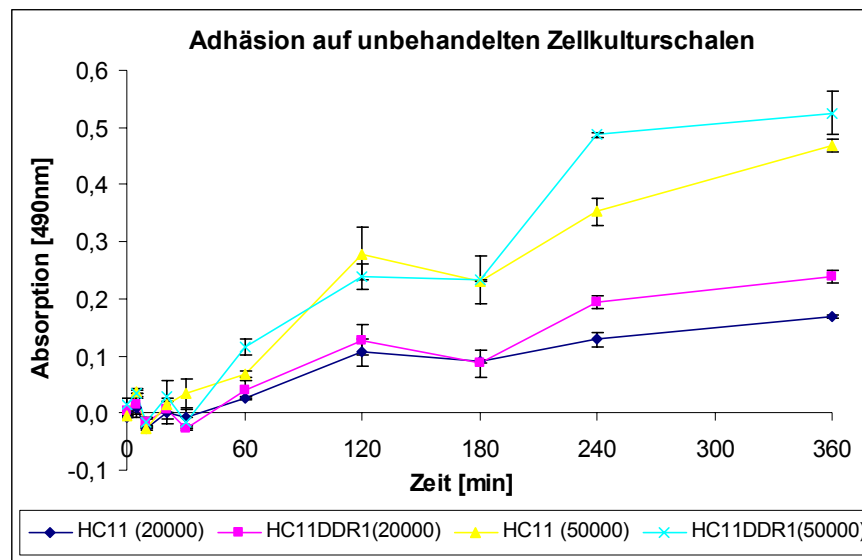
Grafik 3.3 HC11- und HC11DDR1-Zellen proliferierten auf Kollagen beschichteten Zellkulturplatten mit vergleichbaren Kinetiken. 5×10^3 Zellen/Loch wurden in einer Kollagen beschichteten 96-Lochplatte ausgesät. Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe des XTT-Test über vier Tage beobachtet (Vierfach-Bestimmung).

Wie anhand der Grafik 3.3 zu sehen, war die Proliferation von HC11- und HC11DDR1-Zellen auf Kollagen beschichteten Platten vergleichbar. Das bedeutet, die Hemmung der Proliferation, die in Grafik 3.1 zu sehen ist, war nicht ausschließlich auf das Kollagen zurückzuführen. Vorstellbar wäre, dass DDR1 unter Einfluss der laktogenen Hormone die Proliferation der Zellen verhinderte. Es ist aber auch möglich, dass der dreidimensionale Kontext, in dem sich die Zellen befanden, der entscheidende Faktor für die ausbleibende Proliferation war. Wie in Kapitel 1.3 und 1.3.1 erläutert, hat die Matrix, in der sich Zellen befinden, Einfluss auf die Gestalt der Zelle, welche wiederum die Expression vieler Gene steuert. Dies könnte auch in diesem Fall der Grund für die ausbleibende Proliferation der HC11DDR1-Zellen im 3D-Kollagen-Gel gewesen sein.

3.4.5 Adhäsion von HC11-/HC11DDR1-Zellen auf unbehandelten Zellkulturschalen

Ein weiterer wichtiger Parameter, der im Zusammenhang mit der ECM steht, ist die Adhäsion von Zellen auf Zellkulturschalen bzw. einer extrazellulären Matrix. Da DDR1 als Kollagen-Rezeptor auch potenziell ein Adhäsionsprotein ist, wurde der Einfluss der DDR1-Überexpression auf die Adhäsion der HC11-Zellen untersucht.

Dazu wurden HC11- und HC11DDR1-Zellen mit einer Zellzahl von 2×10^4 und 5×10^4 auf unbehandelte 96-Lochplatten ausgesät. Nach der angegebenen Zeit wurde der Zellüberstand mit den nicht adhärenierten Zellen wieder abgenommen, die Platte einmal mit PBS gewaschen und die Anzahl der verbliebenen Zellen mit Hilfe des XTT-Tests ermittelt.

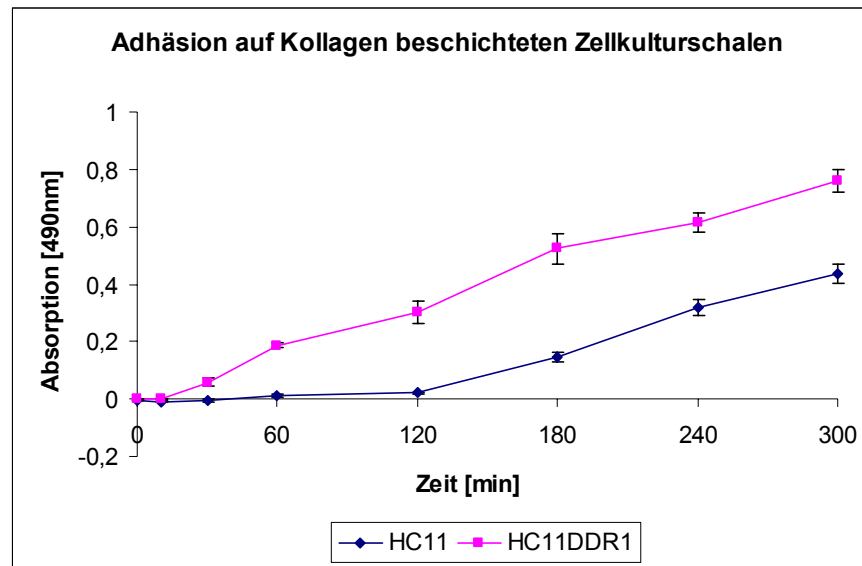


Grafik 3.4 Auf unbehandelten Zellkulturschalen adhärenierten HC11- und HC11DDR1-Zellen mit vergleichbaren Kinetiken. HC11- und HC11DDR1-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 2×10^4 und 5×10^4 Zellen pro Loch auf einer 96-Lochplatte ausgesät (Vierfach-Bestimmung). Nach den angegebenen Zeiten wurden die nicht adhärenierten Zellen abgesaugt, die Platte einmal mit PBS gewaschen und die Anzahl der angehefteten Zellen über einen XTT-Test ermittelt.

Eine merkliche Adhäsion der HC11-Zellen fand erst nach etwa zwei Stunden statt und setzte sich über den beobachteten Zeitraum vom sechs Stunden fort. Wie die Grafik 3.4 zeigt, konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen DDR1 exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen in der Adhäsion auf nicht behandelten Zellkulturschalen beobachtet werden. Die in der Grafik zu erkennende, etwas schnellere Adhäsion von HC11DDR1-Zellen gegenüber HC11-Zellen war nicht signifikant.

3.4.6 Adhäsion von HC11-/HC11DDR1-Zellen auf Kollagen beschichteten Zellkulturschalen

Da Kollagen der natürliche Ligand von DDR1 ist, wurde als nächstes untersucht, ob sich die Adhäsion der Zellen bei der Benutzung von Kollagen beschichteten Platten ändert. Dazu wurden Zellkultur-Platten mit Kollagen beschichtet und ein Adhäsionstest wie oben beschrieben durchgeführt.



Grafik 3.5 HC11DDR1-Zellen adhärirten auf Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen schneller als HC11-Zellen. 5×10^4 HC11- bzw. HC11DDR1-Zellen wurden auf beschichtete 96-Lochplatten aufgetragen und zur angegebenen Zeit wieder abgesaugt. Die Löcher wurden mit PBS gewaschen und die verbleibenden Zellen mit Hilfe des XTT-Tests bestimmt.

In diesem Experiment wurde die Adhäsion von HC11- und HC11DDR1-Zellen auf Kollagen beschichtete Zellkulturplatten untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass HC11DDR1-Zellen im Vergleich zu HC11-Zellen auf Kollagen beschichteten Platten wesentlich schneller adhärirten. Damit konnte der bereits für mesangiale Nierenzellen beschriebene beschleunigende Effekt von DDR1 auf die Adhäsion nun auch in Brustepithelzellen gezeigt werden (Curat & Vogel, 2002).

3.4.7 Differenzierung von HC11-/HC11DDR1-Zellen

3.4.7.1 Nachweis der Expression von β -Kasein auf Proteinebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die beiden Zelllinien sich nicht in ihrer Proliferationsrate unterscheiden, wenn sie sich in einem zweidimensionalen Kontext befinden und nicht mit laktogenen Hormonen behandelt werden, sollte in einem zweiten Ansatz untersucht werden, ob die Überexpression von DDR1 in HC11-Zellen einen Einfluss auf die Expression von Differenzierungsmarkern wie β -Kasein hat.

Wie in Kapitel 2.11.9 erläutert, ist es möglich, HC11-Zellen im zweidimensionalen Kontext zu differenzieren. Dafür ist es nötig, die Zellen für die Wirkung der laktogenen Hormone zu sensibilisieren. Dies wird durch mehrtägige Konfluenz der Zellen erreicht. Während dieser Konfluenz produzieren und sekretieren HC11-Zellen zahlreiche Proteine der extrazellulären Matrix, welche für die Vermittlung der Hormon-Effekte von Bedeutung sind (Chammas *et al.*, 1994). Zellen erhalten in dieser Phase Medium, dem das sonst zur Kultivierung nötige EGF fehlt. Es konnte gezeigt werden, dass HC11-Zellen erst dann die für die β -Kasein-Expression nötigen ECM-Proteine sekretieren, wenn sie zuvor in EGF haltigem Medium kultiviert wurden (Chammas *et al.*, 1994). Nach dieser Vorbehandlung sind HC11-Zellen dann „kompetent“, womit ausgedrückt werden soll, dass sie nach Zugabe der laktogenen Hormone in der Lage sind, zu differenzieren.

Die Zellen wurden daher zunächst für zwei Tage konfluent gehalten, um dann anschließend für zwei Tage die Differenzierung durch Zugabe der laktogenen Hormone Dexamethason, Insulin und Prolaktin (kurz DIP) zu induzieren.

Die erfolgreiche Differenzierung lässt sich durch Nachweis der β -Kasein-Expression überprüfen. Daher wurden HC11-Zelllysate der proliferierenden, „kompetenten“ und mit laktogenen Hormonen behandelten Zellen auf die Anwesenheit von β -Kasein-Protein hin untersucht.

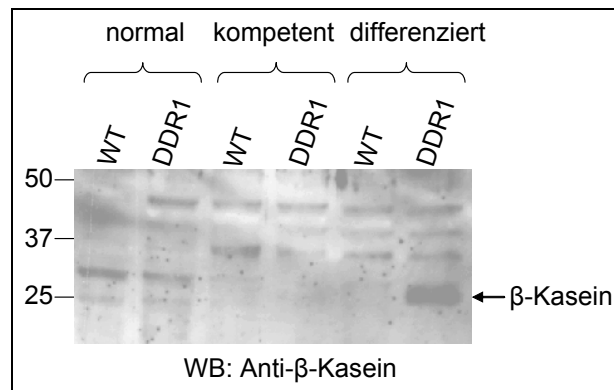


Abbildung 3.11 Die durch Zugabe von DIP induzierte β -Kasein-Expression war in HC11DDR1-Zellen stärker und früher detektierbar als in Wildtyp-Zellen. Proliferierende, kompetente und differenzierte HC11(WT)- und HC11DDR1(DDR1)- Zellen wurden lysiert, die Proteinkonzentration gemessen und 100 μ g Protein auf ein 12 %iges SDS Gel aufgetragen. Das Gel wurde auf eine Membran geblottet und diese anschließend mit einem β -Kasein spezifischen Antikörper behandelt.

Die Analyse der β -Kasein-Expression (Abbildung 3.11) zeigte, dass HC11DDR1-Zellen den terminalen Differenzierungsmarker β -Kasein in hohem Maße exprimierten, während nach zweitägiger Behandlung mit laktogenen Hormonen noch keine β -Kasein-Expression in den parentalen Zellen zu finden war. Dieses Experiment wurde mit gleichem Resultat mehrfach wiederholt. Die fehlende β -Kasein-Expression in den HC11-Zellen in Abbildung 3.11 wurde auf die kurze Inkubationszeit mit laktogenen Hormonen zurückgeführt. HC11-Zellen müssen für den Nachweis von β -Kasein auf Proteinebene mindestens drei Tage mit Hormonen induziert werden (Ball *et al.*, 1988).

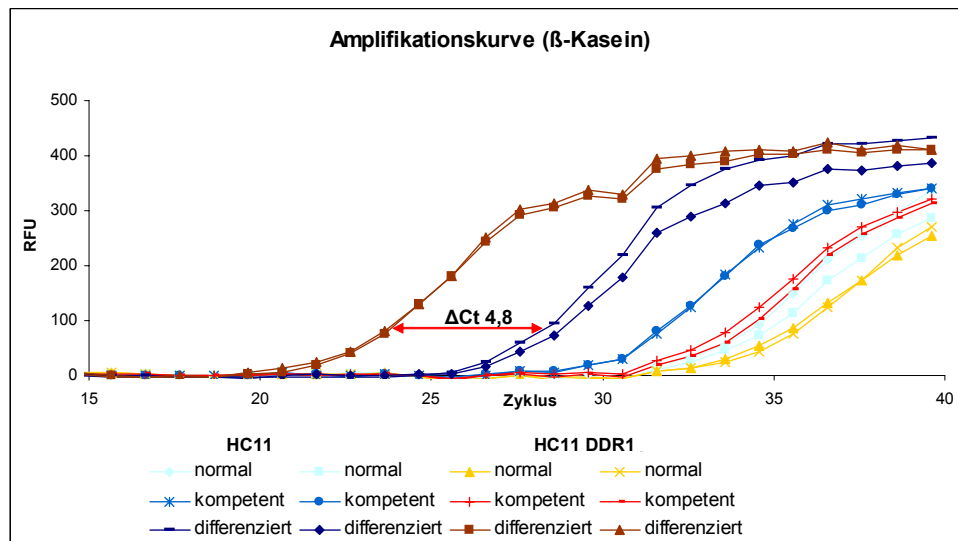
Dieses Experiment legte die unerwartete Vermutung nahe, dass DDR1 nicht etwa die Differenzierung von HC11-Zellen hemmt, wie anhand der Experimente im 3D-Kollagen-Gel angenommen werden konnte (siehe Abbildung 3.10), sondern ganz im Gegenteil die Expression von β -Kasein in den DDR1-Zellen stark erhöht war. Die in Abbildung 3.10 gezeigte Differenzierung im 3D-Kollagen-Gel war, wie durch den Proliferationstest gezeigt werden konnte, von ausgedehnter Proliferation begleitet (siehe Grafik 3.1). Bei dem Nachweis der β -Kasein-Expression wurde dagegen der Zustand der terminalen Differenzierung untersucht, welcher erst nach mehrtägiger Konfluenz zu beobachten ist. Die Ergebnisse des 3D-Kollagen-Tests sind mit der schnelleren und erhöhten β -Kasein-Expression der HC11DDR1-Zellen dann zu vereinbaren, wenn DDR1 die *terminale* Differenzierung der HC11-Zellen beschleunigt. Die Zellen kommen durch DDR1 schneller in den enddifferenzierten Zustand, welcher unter anderem durch einen Stopp der Proliferation gekennzeichnet ist.

Da zur Bildung der milchgängähnlichen Strukturen im Kollagen Gel eine Proliferation nötig ist, waren die HC11DDR1-Zellen dazu nicht in der Lage.

3.4.7.2 Nachweis der Expression von β -Kasein auf RNA-Ebene

Um die oben auf Proteinebene gezeigten Ergebnisse mit Hilfe einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde die β -Kasein-Induktion mit der Real-time-PCR untersucht. Dazu wurde sich der Umstand zu Nutze gemacht, dass die β -Kasein-Induktion auf RNA-Ebene schneller und leichter zu zeigen ist. Parallel zu den Proteinlysaten wurde daher auch RNA aus den normalen, kompetenten und differenzierten Zellen präpariert. Die RNA wurde vermessen und eine definierte Menge (10 μ g) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde für eine Real-time-PCR mit β -Kasein spezifischen Primern verwendet.

A



B

Ct-Werte für:	β -Kasein		GAP-DH	
	HC11	HC11DDR1	HC11	HC11DDR1
Normal	34,7	35,7	23,1	24,2
Kompetent	31,8	34,0	24,8	24,7
Differenziert	28,6	23,8	23,2	24,0

Grafik 3.6 Die β -Kasein-Induktion war in HC11DDR1-Zellen wesentlich stärker als in HC11-Zellen. (A): Das β -Kasein-Transkript wurde mit spezifischen Primern aus der cDNA, die aus proliferierenden, kompetenten und differenzierten Zellen präpariert worden ist, amplifiziert. **(B):** Die Tabelle gibt die Ct-Werte für β -Kasein sowie die Ct-Werte bei Benutzung von GAP-DH-Primern als Kontrolle wieder. Bei den differenzierten Zellen beträgt die Differenz der Zyklen, die benötigt wurden, um den Schwellenwert zu erreichen, 4,8.

Das Ergebnis der Real-time-PCR, welches in der Grafik 3.6 illustriert ist, zeigte wie erwartet, dass die β -Kasein-Expression in den DIP behandelten Zellen induziert wird. Während der Ct-Wert für β -Kasein bei normal proliferierenden HC11-Zellen bei etwa 35 Zyklen lag, verringerte sich die Zyklenzahl bei differenzierten Zellen auf 24-29. Dies würde einer theoretischen Induktion von 64-2048fach entsprechen ($2^{\Delta Ct}$). Sehr eindrucksvoll hingegen war der Unterschied zwischen HC11- und HC11DDR1-Zellen. Die Differenz der Ct-Werte bei den differenzierten Proben lag bei 4,8 Zyklen. Das bedeutet, die Menge an β -Kasein-Transkript war in HC11DDR1-Zellen 28fach höher als in HC11-Zellen. Als Kontrolle wurden GAP-DH (Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase) spezifische Primer verwendet. Dieses Enzym spielt eine Schlüsselrolle bei der Glykolyse. Es wird als „Haushaltsgen“ bezeichnet und vielfach als interner Standard verwendet (Suzuki *et al.*, 2000). Die Ct-Werte für GAP-DH zeigten, dass die Mengen an eingesetzter cDNA in den beiden Proben vergleichbar waren. Die beobachtete Differenz in den Ct-Werten für β -Kasein spiegelte also einen tatsächlichen Unterschied in der Transkription des Gens wider.

β -Kasein ist ein Marker, der den Zustand der Enddifferenzierung zeigt. Das hier gezeigte Ergebnis ließ daher den Schluss zu, dass in den HC11DDR1-Zellen die terminale Differenzierung stark beschleunigt bzw. erhöht war.

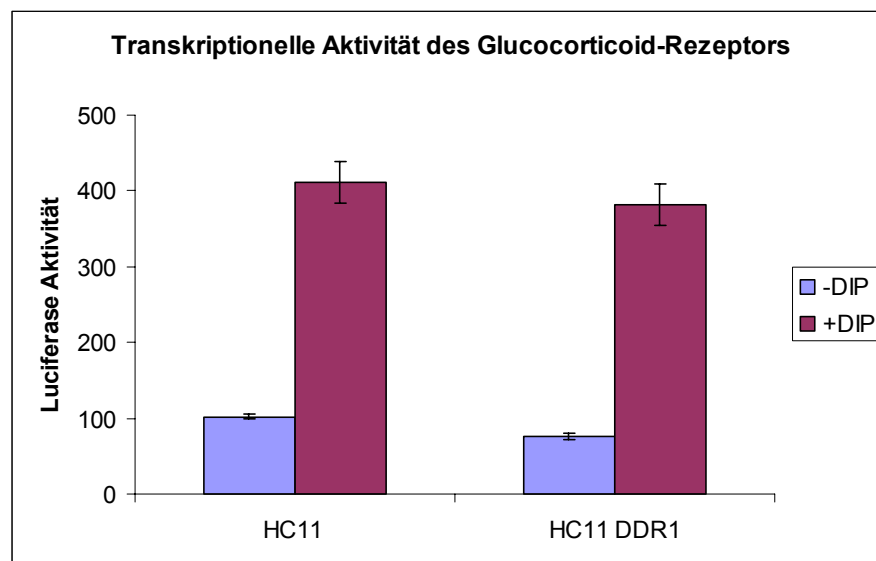
3.4.8 Signaltransduktionskaskade zur Differenzierung von Brustepithelzellen

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass die Differenzierung in DDR1 überexprimierenden Zellen nicht gehemmt, sondern in hohem Maße gefördert wurde, wurden im nächsten Schritt die Signaltransduktionswege, die von Dexamethason, Insulin und Prolaktin angeschaltet werden und dadurch zur Differenzierung von Brustepithelzellen führen, einzeln analysiert. Dies sollte Aufschluss darüber geben, wie DDR1 in den Differenzierungsprozess eingreift.

3.4.8.1 Glucocorticoid-Rezeptor-Signalkaskade

Das Glucocorticoid Dexamethason ist in der Lage, an den nukleären Glucocorticoid-Rezeptor zu binden und diesen in seiner Konformation so zu verändern, dass die Bindung des Rezeptors an ein „Glucocorticoid-response-element“ (GRE) möglich wird. Durch die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren kann schließlich die Transkription eines Zielgens angeschaltet werden (Newton, 2000).

Der Promotor des β -Kasein-Gen besitzt einige halb-palindromische GREs (Rosen *et al.*, 1999), daher ist die Expression von β -Kasein von aktiviertem Glucocorticoid-Rezeptor abhängig (Hennighausen, 1997). Um zu überprüfen, ob die Transkription von Genen mit einem GRE in HC11DDR1-Zellen verstärkt angeschaltet wird, wurde ein Luciferase-Test konzipiert. Dazu wurden HC11- und HC11DDR1-Zellen transient mit einem Luciferase-Reporterplasmid unter der transkriptionellen Kontrolle von vier hintereinander geschalteten GREs transfiziert. Nach Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors kann dieser an die GREs binden und die Transkription von Luciferase induzieren. Zusammen mit diesem Luciferaseplasmid wurde zur Normalisierung der Transfektionseffizienz ein Galaktosidase-Expressionsplasmid mit konstitutivem Promotor transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion durch Entzug von EGF 24 Stunden für die Differenzierung sensitiviert und anschließend 24 Stunden lang mit DIP behandelt. Die Luciferase-Aktivität wurde schließlich durch Zugabe des Substrats Luciferin am Luminometer gemessen und über die ebenfalls gemessene Galaktosidase-Aktivität normalisiert.



Grafik 3.7 Die transkriptionelle Aktivität des Glucocorticoid-Rezeptor war nach DIP-Stimulation in HC11- und HC11DDR1-Zellen vergleichbar. HC11- und HC11DDR1-Zellen wurden transient mit einem Luciferase-Reporterplasmid und einem Galaktosidase-Expressionsvektor transfiziert und mit DIP stimuliert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität ermittelt und mit Hilfe der ebenfalls gemessenen Galaktosidase-Aktivität normalisiert.

Die Auswertung des Luciferase-Tests zeigte, dass sich die Expression von Luciferase gut durch die Zugabe von DIP induzieren ließ (Grafik 3.7). Dies ist auf die Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors durch Dexamethason zurückzuführen. Die Luciferase-Aktivität war vierfach erhöht, wenn DIP dem Medium zugefügt wurde. Allerdings ließ sich kein Unterschied zwischen den DDR1 überexprimierenden und den parental HC11-Zellen beobachten. Daraus wurde geschlossen, dass die erhöhte β -Kasein-Expression in DDR1 überexprimierenden HC11-Zellen nicht auf einen direkten Einfluss von DDR1 auf den Glucocorticoid-Rezeptor zurückzuführen ist.

3.4.8.2 Insulin-Rezeptor-Signaltransduktion

Es ist beschrieben, dass die Zugabe von Insulin zur optimalen Expression von β -Kasein in-vitro essenziell ist (Hennighausen, 1997; Topper & Freeman, 1980). Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob es einen Unterschied zwischen HC11- und HC11DDR1-Zellen in der Aktivierung des Insulin induzierten Signalweges gibt. Um die Aktivierung dieses Signalweges zu untersuchen, wurde die Analyse des Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS1) ausgewählt. IRS1 ist als zentrales Signalmolekül aktiviertem Insulin- sowie IGF-Rezeptor direkt nachgeschaltet. Nach der Bindung von Liganden an den Insulin- oder IGF-Rezeptor wird es von den Rezeptoren mehrfach phosphoryliert (Hadsell *et al.*, 2002; Zhang & Yee, 2000). Zahlreiche SH2- und PTB-haltige Proteine wie Shc, SHP2, Grb2 oder PI3-Kinase können an phosphoryliertes IRS1 binden. HC11- und HC11DDR1-Zellen im normalen, kompetenten sowie differenzierten Stadium wurden lysiert, mit einem Anti-IRS1-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert.

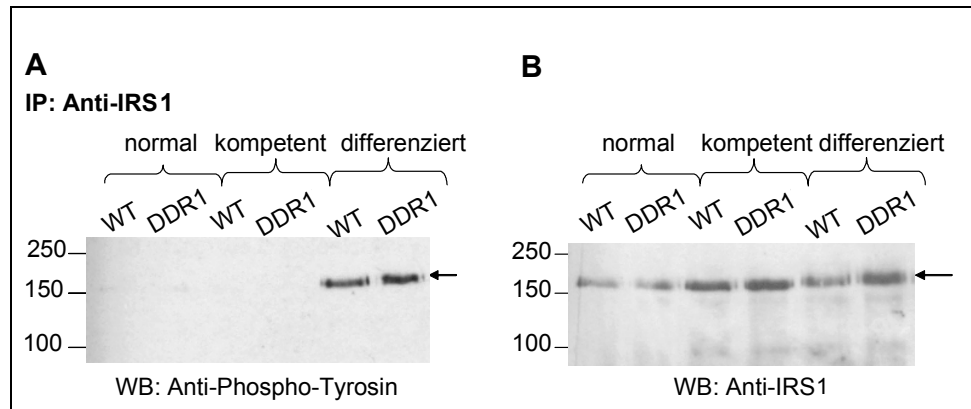


Abbildung 3.12 Die Phosphorylierung von IRS1 war in HC11- und HC11DDR1-Zellen unverändert. (A) 500 µg Zelllysate von proliferierenden, kompetenten und differenzierten HC11- und HC11DDR1-Zellen wurden mit einem Anti-IRS1-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert. **(B)** Zur Ladungskontrolle wurde die Membran gestript und mit einem Anti-IRS1-Antikörper behandelt.

Der Western-Blot (Abbildung 3.12) bestätigte, dass bei Zugabe von DIP die Phosphorylierung von IRS1 induziert wird. Dabei war kein Unterschied zwischen den HC11- und den HC11DDR1-Zellen zu beobachten. Auf den ersten Blick schien die Bande der differenzierten HC11DDR1-Zellen in Abbildung 3.12 (A) stärker zu sein als die der differenzierten HC11-Zellen, doch der Vergleich dieser Spuren mit den Signalen in Abbildung 3.12 (B) machte deutlich, dass hier mehr IRS1-Protein immunpräzipitiert wurde. Das Ergebnis konnte in einem Wiederholungsexperiment mit neu präparierten Zelllysaten bestätigt werden. Aus diesem Experiment ließ sich folgern, dass der Einfluss von DDR1 auf die Expression von β -Kasein nicht im Insulin vermittelten Signalweg liegt.

3.4.8.3 Stat5a/b-Signalkaskade

Zur effektiven Induktion von Milchprotein-Genen wie β -Kasein ist Prolaktin unverzichtbar. Prolaktin bindet an den Prolaktin-Rezeptor, wodurch es zu einer Aktivierung der Jak2 Kinase und schließlich zur Phosphorylierung von Stat5a/b kommt. Phosphoryliertes Stat5a/b dimierisiert und wandert in den Kern, wo es die Transkription von Genen mit einem GAS-Element in ihrem Promotor induzieren kann (siehe 1.2). Der Promotor des β -Kasein-Gens enthält ein solches GAS-Element, wodurch β -Kasein in Anwesenheit von aktiviertem Stat5a/b transkribiert wird (Hennighausen, 1997). Um festzustellen, ob die Überexpression von DDR1 mit dem Prolaktin-Signalweg interagiert, wurde daher die Phosphorylierung von Stat5a/b untersucht.

Dazu wurden HC11- und HC11DDR1-Zellen im normalen, kompetenten und differenzierten Zustand lysiert und im Western Blot mit einem Phospho-Stat5a/b- und einem Stat5a/b-Antikörper analysiert.

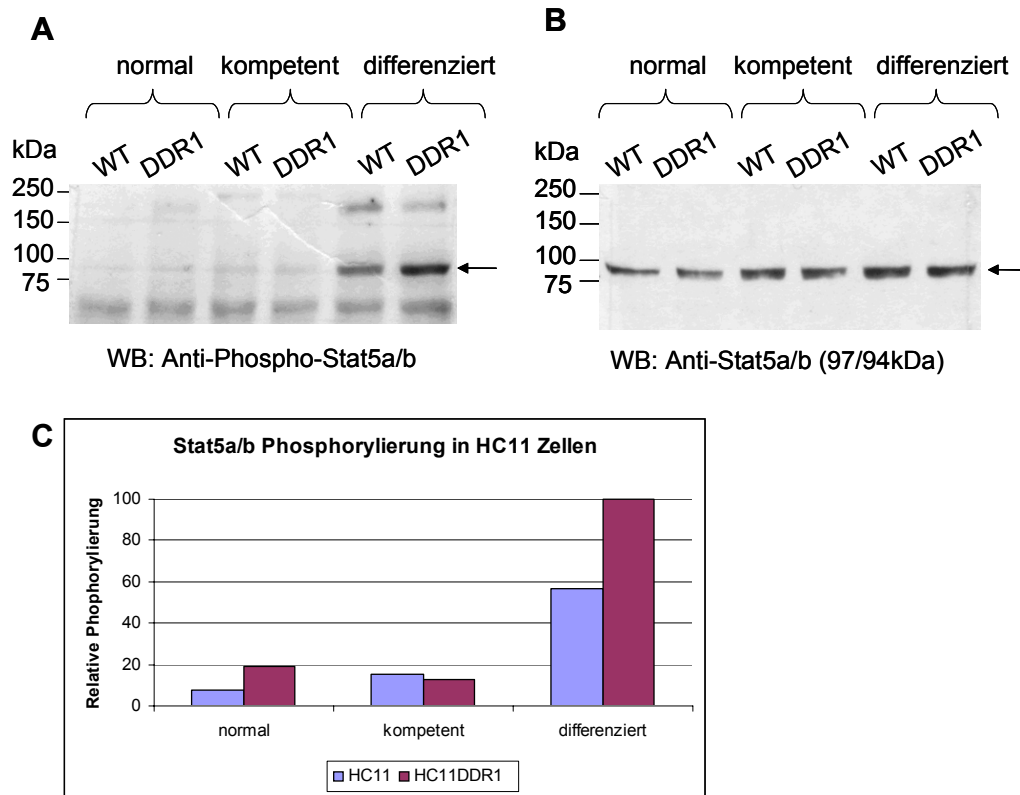


Abbildung 3.13 Die Phosphorylierung von Stat5a/b war in HC11DDR1b-Zellen verstärkt. (A): HC11- und HC11DDR1b-Zellen im normalen, kompetenten und differenzierten Zustand wurden lysiert und einer Western Blot Analyse mit Anti-Phospho-Stat5a/b-Antikörper unterworfen. (B): Die Membran wurde anschließend gestrippt und mit einem Antikörper gegen totales Stat5a/b behandelt. (C): Die Signale in den in A und B gezeigten Western Blot wurden mit Hilfe der TINA Software quantifiziert, die Menge an phosphoryliertem Stat5a/b gegen die totale Menge an Stat5a/b abgeglichen und grafisch aufgetragen

Die Phosphorylierung von Stat5a/b wurde durch Zugabe des DIP induziert (Abbildung 3.13, Spuren 5 und 6). Beim Vergleich der Spuren 5 und 6 in Abbildung 3.13 A wurde weiterhin deutlich, dass in differenzierten HC11DDR1-Zellen die Stat5a/b-Phosphorylierung im Vergleich zu den HC11-Zellen erhöht war. Die Menge an phosphoryliertem Stat5a/b lag bei HC11DDR1-Zellen um fast 50 % höher als bei HC11-Zellen. Die verstärkte Stat5a/b-Phosphorylierung könnte eine Erklärung dafür sein, warum die β -Kasein-Expression in HC11DDR1-Zellen erhöht war. Um die Phosphorylierung von Stat5a/b näher zu untersuchen, wurde ein Kinetik-Experiment durchgeführt.

3.4.8.3.1 Kinetik der DIP induzierten Stat5a/b-Phosphorylierung

Für die Analyse der DIP induzierten Stat5a/b-Phosphorylierung wurden HC11- und HC11DDR1-Zellen wie im Differenzierungsprotokoll (siehe 2.11.9) beschrieben drei Tage im konfluenten Zustand (Medium ohne EGF) gehalten, bevor sie für die angegebenen Zeiten mit DIP induziert wurden.

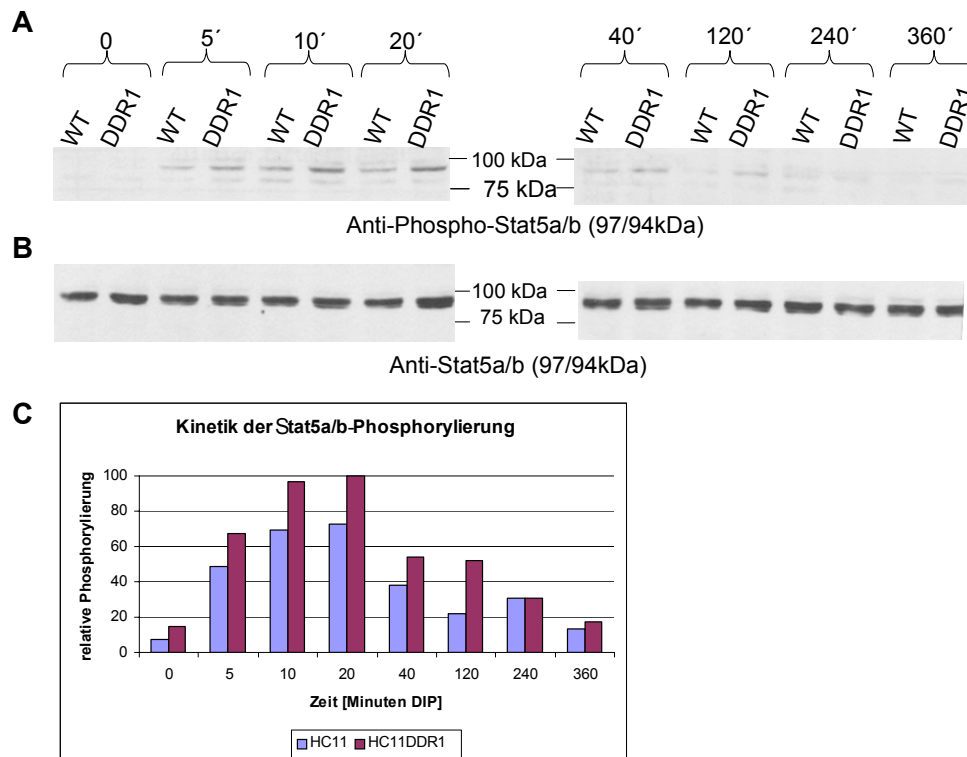


Abbildung 3.14 Die Stat5a/b-Phosphorylierung war in HC11DDR1-Zellen verstärkt und länger anhaltend als in HC11-Wildtyp-Zellen. HC11- und HC11DDR1-Zellen wurden über Nacht mit 10 µg/ml Kollagen I stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit DIP stimuliert und nach den oben angegebenen Zeiten in eiskaltem Lysispuffer lysiert. **(A)**: Die Lysate wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem Anti-Phospho-Stat5a/b Antikörper analysiert. **(B)**: Die Membran wurde gestriipt und zur Normalisierung mit einem Antikörper gegen totales Stat5a/b behandelt. In Abbildung 3.14 **(C)** ist die Intensität der Banden aus **(A)** nach Normalisierung aufgetragen.

Die Kinetik-Analyse zeigte, dass ohne DIP-Stimulation kein oder kaum phosphoryliertes Stat5a/b in HC11- und HC11DDR1-Zellen vorhanden war. Im zeitlichen Verlauf der Stat5a/b-Induktion war zu sehen, dass die Stat5a/b-Phosphorylierung in HC11DDR1-Zellen verstärkt und auch länger anhaltend war.

Die verstärkte Stat5a/b-Phosphorylierung ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Grund für die stärkere und früher auftretende β -Kasein-Expression in den HC11DDR1-Zellen.

Wenn der Effekt der erhöhten Stat5a/b-Phosphorylierung in DIP stimulierten HC11DDR1-Zellen die Folge einer synergistischen Aktivierung des Stat5a/b durch DDR1b war, sollte bei Stimulation des DDR1-Rezeptors auch die Phosphorylierung von Stat5 verstärkt sein. Um diese These zu überprüfen, wurde in einem weiteren Ansatz die Stat5a/b-Phosphorylierung in Abhängigkeit des DDR1-Liganden Kollagen getestet.

3.4.8.3.2 Kollagenabhängigkeit der Stat5a/b Phosphorylierung

Um den Einfluss von Kollagen besser beobachten zu können, wurde im nächsten Experiment die Stat5a/b-Kinetik mit HC11- und HC11DDR1-Zellen mit und ohne Kollagen-Stimulation wiederholt. Dazu wurden die Zellen zwei Tage in konfluentem Zustand und ohne EGF gehalten, um sie für die laktogenen Hormone zu sensibilisieren. Die Kollagen Stimulation erfolgte wieder über Nacht, um die Aktivierung des Rezeptors zu gewährleisten.

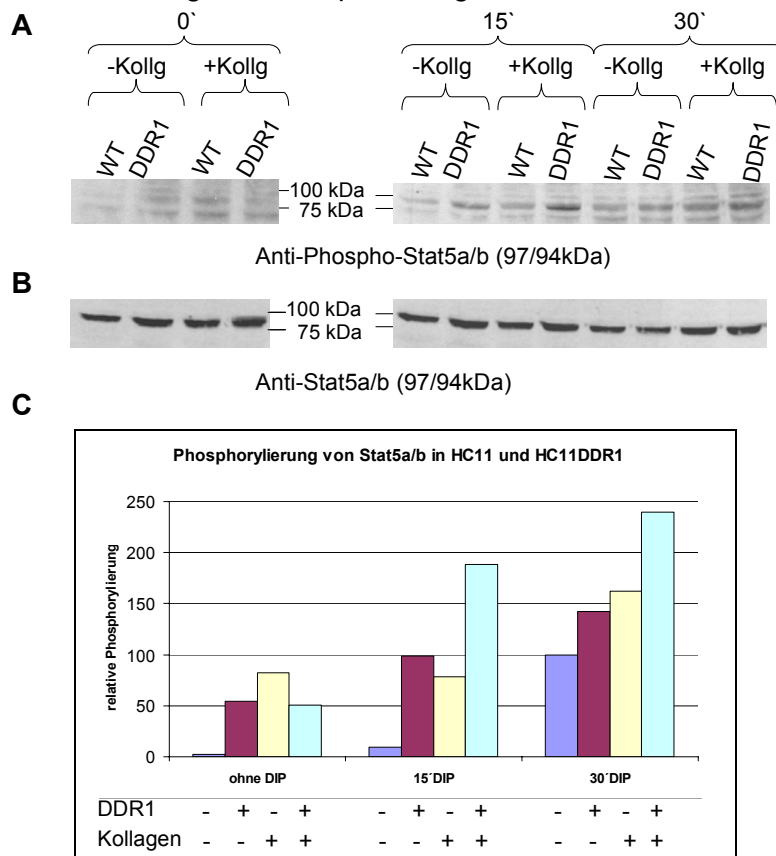


Abbildung 3.15 Die Phosphorylierung von Stat5a/b verstärkte sich durch Zugabe von Kollagen. HC11- und HC11DDR1-Zellen wurden über Nacht mit 10 µg/ml Kollagen stimuliert und am nächsten Tag für die angegebenen Zeiten mit DIP stimuliert. Die Zellen wurden in eiskaltem Tritonpuffer lysiert und das Lysat im Western Blot mit einem Anti-Phospho-Stat5a/b (**A**) bzw. anschließend mit einem Antikörper gegen totales Stat5a/b (**B**) analysiert. Die oben abgebildeten Blots wurden quantifiziert (TINA) und die normalisierten Werte grafisch aufgetragen (**C**).

Auf den Western Blots ist zu sehen, dass die Stat5a/b-Phosphorylierung nach der DIP Stimulation sowohl bei HC11-Zellen als auch bei HC11DDR1-Zellen induziert wurde. Die Quantifizierung der Signalintensitäten, welche in Abbildung 3.15 C grafisch aufgetragen ist, zeigte, dass die Phosphorylierung von Stat5a/b durch Kollagen verstärkt wurde. Bei HC11-Zellen war die DIP induzierte Stat5a/b-Phosphorylierung in Kollagen stimulierten Zellen etwa 20 % stärker als in Zellen ohne Kollagen. Dieser Effekt war bei HC11DDR1-Zellen mit bis zu 50 % mehr phosphoryliertem Stat5a/b in Kollagen stimulierten Zellen wesentlich höher.

Erstaunlicherweise resultierte die Stimulation mit Kollagen auch schon in nicht transfizierten HC11-Zellen in einer deutlichen Stat5a/b-Phosphorylierung. Da diese Zellen kein endogenes DDR1b besitzen (siehe Abbildung 3.8), ist zu vermuten, dass dieser Effekt durch DDR1a vermittelt wird, welches endogen in HC11-Zellen exprimiert wird. Der verstärkte Einfluss, den Kollagen in DDR1b überexprimierenden Zellen auf die Stat5a/b-Phosphorylierung hat, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Expression von DDR1b für die Verstärkung der Stat5a/b-Phosphorylierung verantwortlich ist. Mit anderen Worten, die Aktivierung von DDR1b wirkt synergistisch mit der Aktivierung des Prolaktin-Rezeptors auf die Phosphorylierung von Stat5a/b.

3.5 Charakterisierung von primären Epithelzellen aus Brustdrüsengewebe von Knock-out- und heterozygoten Mäusen

Die Überexpression von DDR1 in HC11-Zellen stellte ein geeignetes Modell dar, um den Einfluss von DDR1 auf die Differenzierung von Brustepithelzellen zu untersuchen. Allerdings kann die Überexpression von DDR1 Effekte haben, die in der Abwesenheit von DDR1 in differenzierter Form auftreten. Daher wurden epitheliale Brustdrüsenzellen aus heterozygoten mit DDR1-Knock-out-Mäusen verglichen. In der DDR1-Knock-out-Maus sind die ersten 13 Exons des DDR1-Gens deletiert, so dass keine der Isoformen mehr exprimiert wird (Vogel *et al.*, 2001).

Drüsengewebe durch CO₂ getöteter, gleichaltriger Mäuse wurde vollständig entnommen. Um die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen, wurde das Gewebe auf einem Schüttler bei 37° C mit Kollagenase verdaut.

Die von Muskelzellen und anhängendem Fettgewebe befreiten Organoide wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt und je nach Anwendung direkt in ein Kollagen-Gel gegeben, oder aber auf normalen Zellkulturschalen ausgesät. Die Morphologie der isolierten (-/-)- und (+/-)-Zellen wurde nach der Differenzierung im 3D-Kollagen-Gel miteinander verglichen. Ebenso wurde die Expression des β -Kasein-Gens analysiert.

3.5.1 Expression von DDR1

Zunächst sollte gezeigt werden, dass die Epithelzellen aus den heterozygoten Mäusen DDR1 exprimieren, während das DDR1-Protein in Zellen aus dem DDR1-Knock-out-Gewebe nicht zu finden ist. Dazu wurden die isolierten primären Brustepithelzellen lysiert und nach einer Präzipitation mit Concanavalin-A-Sepharose im Western Blot auf die Anwesenheit des DDR1-Proteins analysiert.

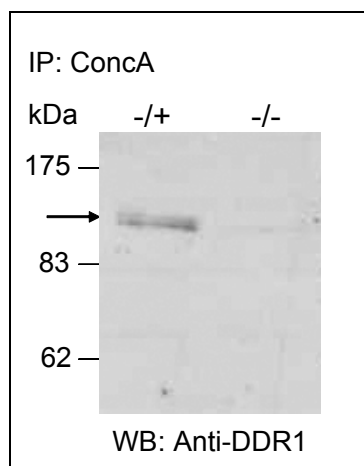


Abbildung 3.16 Die aus DDR1(+/-)-Mäusen isolierten primären Brustepithelzellen exprimieren DDR1. Totallysate von Brustepithelzellen aus (-/+)- und (-/-)-Mäusen wurden mit Concanavalin-A-Sepharose Beads präzipitiert. Das Präzipitat wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit einem Antikörper gegen DDR1 analysiert.

Wie in Abbildung 3.16 zu sehen, exprimierten die aus den heterozygoten Mäusen isolierten Brustepithelzellen DDR1.

Es konnte gezeigt werden, dass DDR1 von Epithelzellen exprimiert wird, nicht aber von mesenchymalen Zellen (Alves *et al.*, 1995). Daher kann das Vorhandensein von DDR1 in den (+/-)-Zellen auch als Hinweis dafür angesehen werden, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Epithelzellen handelte. Darüber hinaus entsprach das mikroskopische Aussehen (kubische, polygonische Zellen) dem Erscheinungsbild von Epithelzellen.

3.5.2 Verhalten in 3d-Kollagen-Kulturen

Wie in Kapitel 3.4.1 gezeigt wurde, war die Fähigkeit von HC11-Zellen, im Kollagen-Gel milchgangähnliche Strukturen auszubilden, durch die Überexpression von DDR1 inhibiert. Um zu erfahren, ob die völlige Abwesenheit von DDR1 das Auftreten der differenzierten Strukturen verstärkt bzw. beschleunigt, wurde die Fähigkeit der beiden Zellpopulationen, im 3D-Kollagen-Gel morphologisch zu differenzieren, untersucht. Dazu wurden sowohl intakte Organoiden direkt nach der Isolation als auch Einzelzellen in ein Kollagen-Gel gegeben und mit laktogenen Hormonen behandelt.

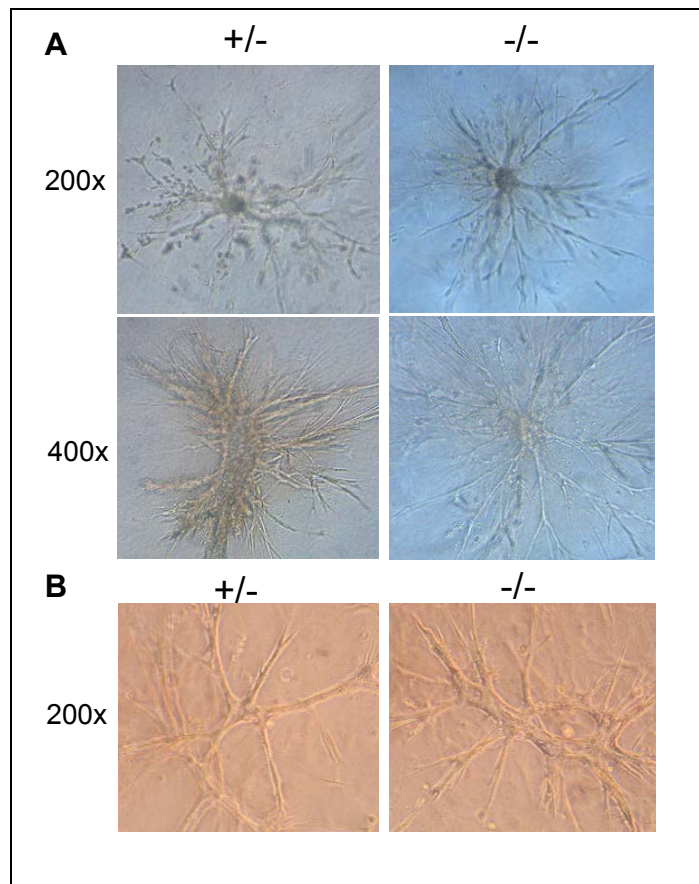


Abbildung 3.17 Es war kein lichtmikroskopisch erkennbarer, morphologischer Unterschied zwischen den aus DDR1-Knock-out und heterozygoten Mäusen isolierten Brustepithelzellen zu sehen. Die Organoiden wurden unmittelbar nach der Präparation in ein Kollagen-Gel gebettet und mit laktogenen Hormonen behandelt. Für die Gewinnung von Einzelzellen wurden Organoiden auf Zellkulturschalen ausgesetzt, nach zwei Tagen trypsiniert und erneut ausgesät. **(A)**: Organoiden nach sieben Tagen im Kollagen-Gel. **(B)** Einzelzellen nach vier Tagen im Kollagen-Gel mit laktogenen Hormonen.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass es keinen lichtmikroskopisch sichtbaren Unterschied zwischen den DDR1(-/-) und den DDR1(+/-)-Zellen gab.

Die aus der Brustdrüse isolierten DDR1(+/-)- und (-/-)-Zellen proliferierten und zeigten die für die Differenzierung von Brustepithelzellen charakteristische Ausbildung von Fortsätzen, die an Milchgänge erinnern. Die DDR1(-/-)-Zellen waren in der Ausbildung differenzierter Strukturen weder schneller noch bildeten sie Verzweigungen im Vergleich zu den DDR1(+/-)-Zellen vermehrt aus. Die Abwesenheit von DDR1 beschleunigte bzw. verstärkte die morphologische Differenzierung von Brustepithelzellen also nicht, was der Umkehrschluss zu den Experimenten mit DDR1 überexprimierenden Zellen gewesen wäre.

Da in den Versuchen mit HC11-Zellen gezeigt werden konnte, dass die morphologische Differenzierung in-vitro nicht mit der funktionellen Differenzierung gleichgesetzt werden kann, d. h. die Ausbildung von Milchgängen im Kollagen-Gel kein geeigneter Hinweis für die terminale Differenzierung ist, wurde anschließend das Vorhandensein von Milchproteinen geprüft. Für primäre Zellen gilt, dass diese durch Einfluss von laktogenen Hormonen nur dann zur Expression von Milchproteinen induziert werden können, wenn sie sich in einer geeigneten Matrix befinden (Edwards *et al.*, 1996; Streuli & Bissell, 1991). Deshalb wurden die primären Zellen zunächst über einen längeren Zeitraum (14 Tage) unter Einfluss von laktogenen Hormonen im 3D-Kollagen-Gel gehalten. Anschließend wurden sie direkt im Gel lysiert und nach Abzentrifugieren der unlöslichen Kollagenbestandteile im Western Blot wurde die Expression von Milchproteinen analysiert.

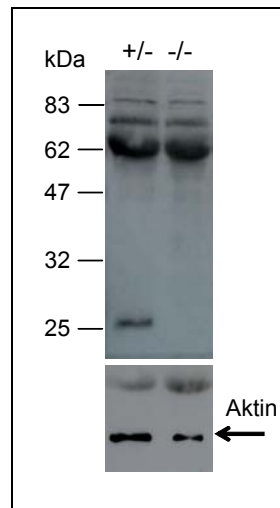


Abbildung 3.18 DDR1(+/-)- aber nicht DDR1(-/-)-Brustepithelzellen exprimierten ein ca. 26kDa großes Milchprotein. (-/-)- bzw. (+/-)-Brustepithelzellen wurden in einem Kollagen-Gel 14 Tage mit laktogenen Hormonen behandelt. Anschließend wurde das Gel in Lysispuffer homogenisiert, die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Abbildung zeigt die gebloottete Membran, die mit einem Anti-Milch-Antikörper behandelt wurde (Western Blot von C.McFadden angefertigt).

In der Western Blot Analyse (Abbildung 3.18) trat eine ca. 26 kDa große Bande nur in den (+/-)-Zellen, nicht aber in den (-/-)-Zellen auf. Da für dieses Experiment im Gegensatz zu den Experimenten mit den HC11-Zellen (Anti- β -Kasein-Antikörper) ein polyklonaler Antikörper verwendet wurde, der gegen Milchproteine gerichtet ist, ließ sich die Identität der Bande nicht mit absoluter Sicherheit feststellen. Aufgrund ihrer Größe ist aber stark anzunehmen, dass es sich dabei um das β -Kasein-Protein handelte.

Der Western Blot zeigte, dass die Zellen, obwohl sie im 3D-Kollagen-Gel morphologisch differenzierten, was durch das Auftreten von milchgang-ähnlichen Strukturen zu erkennen war, dennoch keine Differenzierungsmarker exprimierten, die kennzeichnend für eine terminale Differenzierung sind. Obwohl die Zellen also lichtmikroskopisch im Kollagen-Gel keinen Unterschied zeigten, exprimierten sie nicht die gleichen Milchproteine. Das fehlende DDR1 in den Brustepithelzellen war offensichtlich der Grund, weshalb Knock-out-Zellen eine vergleichsweise normale Morphologie im 3D-Gel zeigten, aber nicht in der Lage waren, Proteine wie das β -Kasein, die für die Enddifferenzierung kennzeichnend sind, zu exprimieren. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung zu den HC11-Daten, die zeigten, dass die Überexpression von DDR1 die Expression von β -Kasein verstärkte.

4 Diskussion

4.1 Zielgene von DDR1 und DDR2 in induzierbaren Zellsystemen

4.1.1 Reprimierbare DDR-Expression in Zelllinien

ECM-spezifische Microarrays dienen zur Identifizierung von Genen, die durch die Kollagen-Rezeptoren DDR1 und DDR2 in ihrer Expression beeinflusst werden. Um für die Experimente eine Kontrolle verwenden zu können, die der Probe so ähnlich wie möglich ist, wurden induzierbare Zelllinien generiert. Das induzierbare System „Tet-off“ (Gossen & Bujard, 1992) ermöglicht es, für Probe und Kontrolle denselben Zellklon zu verwenden, da sich die Expression des transfizierten Rezeptors durch die Zugabe von Tetracyclin oder des effektiveren Analogs Doxycyclin abschalten lässt (Gossen *et al.*, 1995). Die Repression des transfizierten Gens ist dabei sehr effektiv und schnell (Berens & Hillen, 2003). Die Transfektion von NIH3T3- und HT1080-Zellen mit dem „Tet-off“-System war erfolgreich, es wurden für jede Zelllinie mindestens 18 Klone erhalten (Tabelle 3.1). Von diesen wurden etwa 10 Klone pro Rezeptor und Zelllinie auf die Expression von DDR getestet. Dabei waren zwischen 20 % und 30 % positiv für DDR1 bzw. DDR2.

Da nicht von vornherein auszuschließen war, dass die Zugabe von Doxycyclin selbst die Expression von Genen verändert, wurde für jede Zelllinie (NIH3T3 und HT1080) jeweils eine Kontrollzelllinie generiert, in die alle Elemente des „Tet-off“-Systems mit Ausnahme des Rezeptor-Expressionsplasmids transfiziert wurden. Mit dieser Zelllinie wurden ebenfalls Microarray-Experimente durchgeführt, in denen Doxycyclin behandelte Zellen mit unbehandelten Zellen verglichen wurden. So konnten jene Gene aus der Auswertung ausgeschlossen werden, deren Expression sich durch die Zugabe von Doxycyclin allein ändert.

Bei Betrachtung der Tabelle 3.1 fällt auf, dass wesentlich mehr Klone (>100 bzw. 70) in der Positivkontrolle (kein DDR-Expressionsplasmid) erhalten wurden als bei den DDR exprimierenden Zellen (zwischen 18 und 59 Klone). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Zellen der Positivkontrolle jeweils nur mit zwei Plasmiden gleichzeitig transfiziert wurden, während die DDR exprimierenden Zellen mit je drei Plasmiden behandelt wurden.

Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle das Hygromycin-Resistenzplasmid und das Transaktivator-Expressionsplasmid aufnimmt, bei der Positivkontrolle größer als bei den zusätzlich mit DDR-Expressionsplasmid transfizierten Zellen.

4.1.2 Überprüfung der induzierbaren DDR-Expression

Die erhaltenen DDR-positiven Zellklone wurden mit Doxycyclin behandelt, um die Reprimierbarkeit der DDR-Expression zu untersuchen. In allen getesteten Zellklonen war die Expression von DDR nach drei Tagen Doxycyclin-Behandlung nicht mehr im Western Blot detektierbar (Abbildung 3.3). Da sowohl das DDR als auch das Hygromycin-Resistenzgen unter der transkriptionellen Kontrolle des Transaktivators stehen, konnte mit Hygromycin gleichzeitig auf das Vorhandensein des Transaktivators selektiert werden. Somit überlebten nur solche Zellen die Selektion, welche den Transaktivator exprimieren.

Die Repression der DDR-Expression war schnell und sehr effektiv. Im Western Blot war bereits nach einem Tag Doxycyclin-Zugabe eine stark verminderte DDR-Expression zu sehen, die nach zwei Tagen vollständig verschwunden war. Das System war selbst über einen längeren Zeitraum stabil, denn es kam, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, selbst nach sieben Tagen Doxycyclin-Behandlung nicht zu einer detektierbaren DDR-Expression. Solche Beobachtungen bei der Anwendung des „Tet-off“-Systems sind in der Literatur vielfach beschrieben worden (Baasner *et al.*, 1996; Gossen & Bujard, 1992). Das „Tet-off“-System hat im Vergleich zum „Tet-on“-System den Vorteil, dass die Hintergrundexpression sehr niedrig ist und auch die Menge an benötigtem Doxycyclin um zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger ist, was die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Nebeneffekten verringert (Mizuguchi & Hayakawa, 2001).

4.1.3 Deregulierte Gene in DDR überexprimierenden HT1080- und NIH3T3-Zellen

Die induzierbaren Zelllinien wurden mit Hilfe von ECM-spezifischen Microarrays analysiert. Diese Microarrays erlaubten es, sich auf die Identifizierung von Matrix-Genen bzw. Matrix assoziierten Genen zu konzentrieren, da diese für Matrix-Rezeptoren wie DDR1 und DDR2 eine besondere Rolle spielen. Allerdings war es mit diesem Ansatz nur möglich, solche Gene als Zielgene zu identifizieren, welche schon in irgendeiner Weise mit der ECM in Verbindung gebracht worden sind. So wurden insgesamt etwa 225 Gene untersucht.

Dabei wurden in den DDR1 bzw. DDR2 generierten Zelllinien 25 (NIH3T3) bzw. 29 (HT1080) Gene dereguliert gefunden. Die Microarray-Daten zeigten, dass DDR1 und DDR2 gemeinsame Zielgene besitzen. Es konnten aber auch zahlreiche Gene gefunden werden, die entweder von DDR1 oder DDR2 reguliert wurden. Die Kinasen LIMK1 und 2 (LIM domain kinase) wurden in HT1080- und NIH3T3-Zellen nur von DDR2 induziert, nicht aber von DDR1 (siehe Tabelle 3.3). LIMK ist eine Kinase, die in der Entwicklung des Nervensystems eine große Rolle spielt (Sarmiere & Bamburg, 2002). Sie wird von ROCK (Rho assoziierte Kinase) und PAK (p21 aktivierte Kinase) aktiviert und nimmt über die Phosphorylierung von Cofilin Einfluss auf die Formation von Synapsen (Endo *et al.*, 2003). Ein Zusammenhang mit DDR2 konnte bisher nicht beobachtet werden. In HT1080-Zellen war weiterhin Aggrecan nur von DDR2 induziert, während in NIH3T3-Zellen das DDR2-Protein BMP2 und 4 induzierte (siehe dazu 4.1.3.6).

Ebenso fanden sich zahlreiche Gene, die nur von DDR1 in ihrer Transkription beeinflusst wurden. Integrin α L, α 1b und β 8 wurden nur in DDR1 über-exprimierenden HT1080-Zellen induziert. In NIH3T3-Zellen dagegen wurden Integrin α 1b, β 1 und β 4 von DDR1 dereguliert. Die DDR-Rezeptoren haben also einen Einfluss auf die Transkription von Integrinen, wobei im humanen und murinen System jeweils unterschiedliche Integrine betroffen sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass in humanen und murinen Zellen unterschiedliche Gene von DDR1 und 2 reguliert wurden. Dies kann darauf beruhen, dass DDR1 und 2 je nach Spezies unterschiedliche Signalwege hat. Beim Vergleich der HT1080 mit NIH3T3 generierten Daten ist aber auch zu beachten, dass sich zwar beide Zelllinien von Fibroblasten ableiten, HT1080-Zellen jedoch durch konstitutiv aktiviertes N-ras im Gegensatz zu NIH3T3-Zellen in hohem Maße transformiert sind (Rasheed *et al.*, 1974). Auch dies könnte eine Erklärung für die Unterschiede der in NIH3T3 und HT1080 gefundenen Zielgene sein.

Die Transkription zahlreicher struktureller Matrixproteine wie Fibrilline, Matrilin oder Kollagene war in beiden Zelllinien hochreguliert. Daraus geht hervor, dass die beiden Kollagen-Rezeptoren die sie umgebende Matrix verändern können. Weitere interessante Befunde werden im Folgenden näher erläutert.

4.1.3.1 In DDR überexprimierenden Zelllinien ist die Transkription von Agrin reprimiert

Das im Microarray-Experiment von DDR1 und DDR2 am stärksten deregulierte Gen war mit durchschnittlich 4,7facher Repression Agrin (siehe Tabelle 3.2). Agrin ist ein 200 kDa großes Heparansulfat-Glykoprotein der postsynaptischen Basalmembran (Bezakova & Ruegg, 2003). Es wird in Motoneuronen synthetisiert und in den synaptischen Spalt sekretiert. Agrin wird eine Schlüsselrolle in der Formation postsynaptischer Strukturen der Motoneuronen zugeschrieben. Durch die Bindung eines Proteinkomplexes, in welchem Agrin eine wichtige Komponente ist, wird MuSK (Muskel spezifische RTK) aktiviert (Kleimann, 1996). Diese sorgt über Rac und PAK für die Aggregation von Acetylcholin-Rezeptoren. Agrin kann aber auch über Laminine mit den Integrinen interagieren und Einfluss auf das Zytoskelett nehmen (Bezakova & Ruegg, 2003).

Die Unterdrückung der Agrin-Expression in isolierten Neuronen des Hippocampus sorgt im Vergleich zu Kontroll-Neuronen für ein ausgedehnteres Längenwachstum der Axone (Mantych & Ferreira, 2001). Rekombinantes Agrin dagegen kann das Auswachsen von Axonen hemmen, während es die Ausbildung von Verzweigungen erhöht, hat also genau den gegenteiligen Effekt. Interessanterweise konnte für isolierte Neurone aus dem Kleinhirn gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von DDR1 die Verlängerung der Axone ebenfalls behindert ist (Bhatt *et al.*, 2000). Das Fehlen von DDR1 hatte hier also die gleichen Auswirkungen auf Neurone wie die Überexpression von Agrin. Basierend auf den hier vorliegenden sowie den bereits publizierten Daten kann ein Modell postuliert werden, in dem DDR1 in neuronalen Zellen für eine Repression von Agrin verantwortlich ist (siehe Abbildung 4.1). Diese These wird durch die hier gezeigten Daten gestützt, die zeigen, dass eine Überexpression von DDR die Expression von Agrin hemmt. Ein solcher Zusammenhang zwischen DDR und Agrin ist bisher noch nicht gezeigt worden. Zusammenfassend kann man anhand dieser Daten annehmen, dass DDR1 in neuronalen Zellen für die Repression von Agrin verantwortlich ist, was ein Auswachsen der Axone ermöglicht. Die Repression von Agrin durch DDR konnte in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 sowie in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 beobachtet werden. Weitere Experimente, bei denen insbesondere der Agrin-Promotor untersucht werden sollte, könnten Aufschluss darüber geben, wie DDR1 und DDR2 die Transkription von Agrin beeinflussen.

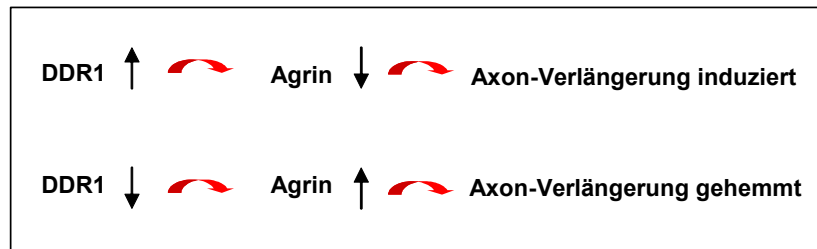


Abbildung 4.1 Modell für den Einfluss von DDR1 auf Agrin

4.1.3.2 Matrix degradierende Proteine

Sowohl in DDR1 als auch in DDR2 überexprimierenden NIH3T3- und HT1080-Zellen sind Matrix degradierende Proteine wie einige MMPs verstärkt transkribiert. Eine erhöhte MMP1-Expression konnte nach Kollagen-Stimulation in DDR2 überexprimierenden HT1080-Zellen bereits gezeigt werden (Vogel *et al.*, 1997).

Die in DDR1 und DDR2 überexprimierenden NIH3T3-Zellen hochregulierten MMPs (MMP3, -7 und -10) haben eine Reihe von gemeinsamen Substraten wie zum Beispiel Kollagen IV, Gelatine, Fibronectin und Proteoglykan (Nabeshima *et al.*, 2002). MMP3 und MMP7 sind nahe miteinander verwandt und haben praktisch die gleiche Substratspezifität (Chambers & Matrisian, 1997). Ob die erhöhte Expression Matrix abbauender Enzyme eine Folge der DDR-Überexpression oder aber eine Reaktion auf die erhöhte Matrixprotein-Transkription ist, lässt sich anhand der Ergebnisse nicht feststellen. Dazu müsste man die gefundenen Matrixproteine überexprimieren und nachprüfen, ob sich dadurch die Expression der Matrix-abbauenden Proteine verändert.

Die Ergebnisse zeigen, dass DDRs nicht nur in der Lage sind, Signale von außerhalb der Zelle nach innen weiterzuleiten, sondern auch das die Zelle umgebende, extrazelluläre Milieu beeinflussen können. Ein solcher bidirektionaler Weg der Signale ist bereits für Integrine beschrieben worden (Howe *et al.*, 1998). DDR1 und DDR2 nehmen also Einfluss auf die Zusammensetzung der ECM.

4.1.3.3 Integrine

In HT1080DDR1-Zellen waren zahlreiche Integrine (sowohl α - als auch β -Untereinheiten) hochreguliert. In HT1080DDR2-Zellen war dagegen nur β 7-Integrin induziert. Eine Repression der Transkription durch DDR1 und DDR2 wurde sowohl in NIH3T3- wie auch in HT1080-Zellen für die α 3-Integrin-Untereinheit gefunden. α 3-Integrin kann nur mit β 1-Ketten Heterodimere bilden und ist ein Rezeptor für Epiligrin und Invasin (Ploew *et al.*, 2000). Die β 1-Integrin Untereinheit war in DDR1 überexprimierenden NIH3T3-Zellen ebenfalls reprimiert. Interessanterweise ist β 1 die einzige Untereinheit, die zusammen mit α 1, α 2, α 10 und α 11 als Kollagen-Rezeptor fungieren kann (Ploew *et al.*, 2000). Vorstellbar wäre, dass durch die Überexpression des Kollagen-Rezeptors DDR die β 1-Untereinheit des Integrins herunterreguliert wird und daraufhin die Transkription des α 3-Integrins durch einen Rückkopplungsmechanismus reprimiert wird, weil die gebildeten Untereinheiten keinen Dimerisierungspartner mehr finden. In diesem Fall wäre α 3-Integrin ein indirektes Zielgen von DDR. Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass die Signalweiterleitung von DDR unabhängig von β 1-Integrin ist und bei Abwesenheit von β 1 unverändert bleibt, das bedeutet jedoch nicht, dass die Transkription des β 1-Integrins nicht durch die Überexpression des DDRs gehemmt sein könnte (Vogel *et al.*, 2000).

4.1.3.4 PGS2 (Decorin)

Das Proteoglykan Decorin (PGS2) war in beiden Zelllinien durch DDR1 und DDR2 hochreguliert. Es war mit durchschnittlich 2,4facher Deregulation leicht induziert. Decorin bindet Kollagen I und II und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym während der Organentwicklung (Scholzen *et al.*, 1994). Die fehlende Induktion dieses Protein könnte ein Grund für die mangelnde Differenzierung der Brustdrüse in den DDR1-Knock-out-Mäusen sein, die in hohem Maße von der Interaktion zwischen dem Epithel und dem Mesenchym abhängig ist (Werb *et al.*, 1996).

4.1.3.5 PSGL-1

Auch PSGL-1 war bis zu dreifach in beiden Zelllinien hochreguliert. Es ist ein Glykoprotein, das als Ligand für P- und E-Selectin fungiert (Laszik *et al.*, 1996). In Leukozyten vermittelt es die bei Entzündungen notwendige Adhäsion an vaskuläre Endothelzellen. PSGL-1 wird aber auch in der Zona pellucida der Oozyten exprimiert. Es ist dort für die Interaktion der Eizelle mit Spermazellen verantwortlich (Geng *et al.*, 1997).

Bei der Interaktion der beiden Zellen spielt auch das murine Protein SED1 eine wichtige Rolle (Ensslin & Shur, 2003). Interessanterweise vermitteln zwei Discoidin-Domänen in diesem Protein die Bindung von Spermazellen an unbefruchtete Eizellen. Diese Beobachtung zeigt, dass Proteine mit Discoidin-Domänen bei der Interaktion von Spermazellen mit der Zona pellucida eine wichtige Funktion haben.

In DDR1-Knock-out-Mäusen wurde eine niedrige Implantationseffizienz befruchteter Eizellen beobachtet (Vogel *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass die Induktion von PSGL-1 in DDR1-Knock-out-Mäusen gestört ist und dadurch die Adhäsion der Eizelle an das Uterusepithel vermindert ist.

4.1.3.6 BMP (Bone morphogenic protein)

Anders als bei HT1080-Zellen waren in NIH3T3 zahlreiche BMPs (Bone morphogenic protein) in ihrer Transkription erhöht. BMPs bilden die größte Gruppe in der TGF β -Familie. Sie binden an BMP-Rezeptoren (zunächst Rezeptor I, welcher dann II aktiviert) und können über die Phosphorylierung von Smad die Transkription von Zielgenen bewirken (Botchkarev, 2003). BMPs sind für die Wirbeltierentwicklung nicht nur bei der Embryogenese von außerordentlicher Bedeutung. Sie sind auch für den Erhalt und die Reparatur von Knochen und anderen Geweben im adulten Organismus verantwortlich. (Massague & Chen, 2000). NIH3T3DDR1-Zellen zeigten eine hohe Überexpression von BMP5 und BMP7 (5fach bzw. 8fach) während NIH3T3DDR2-Zellen eine mäßige Überexpression von BMP2, 4, 5 und 7 hatten. DDR1 und DDR2 könnten also über die Regulation der BMP-Transkription eine wichtige Rolle beim Erhalt und der Erneuerung von Gewebe wie z. B. dem Knochen spielen. Vorstellbar wäre auch, dass das beobachtete, verminderte Wachstum der DDR1-Knock-out-Mäuse auf eine mangelnde Induktion von BMP5 und BMP7 zurückzuführen ist.

Die Microarray-Analyse der induzierbaren Zelllinien zeigte, dass in NIH3T3- und HT1080-Zellen jeweils unterschiedliche Zielgene von DDR1 und DDR2 reguliert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die unterschiedlichen Expressionsprofile der beiden Zelllinien einen Einfluss auf die durch Expression von DDR regulierten Gene haben. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die beiden Rezeptoren in humanen und murinen Zellen jeweils unterschiedliche Signalwege besitzen und daher die Transkription unterschiedlicher Zielgene beeinflussen.

Aber auch der unterschiedliche Grad der Transformation in beiden Zelllinien könnte die DDR1 und DDR2 induzierte Signaltransduktion beeinflussen. DDR1 und DDR2 stehen als Rezeptoren am Anfang der Signalkaskaden, die Transkription der Zielgene ist damit von weiteren Signalmolekülen wie Adaptorproteinen oder zytoplasmatischen Tyrosinkinasen abhängig, die die Effekte vermitteln. Die Expression bzw. Aktivierung dieser Signalmoleküle hat also Einfluss darauf, in welchem Maße aktiviertes DDR1 oder DDR2 die Transkription von Zielgenen beeinflusst. Es ist gut vorstellbar, dass außer der bereits bekannten Expression von konstitutiv aktivem N-ras in HT1080-Zellen auch andere Signalmoleküle in ihrer Expression oder Aktivierung in HT1080- und NIH3T3-Zellen jeweils unterschiedlich sind.

4.2 Analyse der Genexpression in der Brustdrüse schwangerer DDR1-Knock-out-Mäuse

Bei der Suche nach Genen, die in DDR1 oder DDR2 überexprimierenden Zelllinien dereguliert sind, war die Anzahl der analysierten Gene begrenzt (etwa 225). Diese waren nach ihrer Bedeutung für die extrazelluläre Matrix ausgesucht worden. Mit Hilfe dieser Arrays konnten Gene untersucht werden, von denen eine Verbindung mit der ECM bereits bekannt ist. Um einerseits ein größeres Spektrum an Genen zu untersuchen und andererseits die Rolle von DDR1 speziell in der Brustdrüse zu erhellen, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit Arrays verwendet, die ca. 15.000 Gene enthalten. Bei diesen Experimenten wurde Brustdrüsengewebe aus DDR1-Knock-out-Mäusen mit Brustdrüsengewebe aus phänotypisch gesunden, heterozygoten Mäusen verglichen. Brustdrüsengewebe wurde verwendet, da DDR1-Knock-out-Mäuse hier den ausgeprägtesten Phänotyp zeigen. Die mütterliche Brustdrüse ist zum Zeitpunkt der Geburt ungenügend differenziert und nicht in der Lage zu lactieren (Abbildung 1.8 und Vogel *et al.*, 2001). Da die Expression von DDR1 während der Schwangerschaft stetig ansteigt und ihr höchstes Niveau gegen Ende der Schwangerschaft erreicht, wurde zum Vergleich der Genexpression von DDR1-Knock-out-Mäusen mit heterozygoten Mäusen RNA aus Brustdrüsen von hochschwangeren Mäusen (E18,5) isoliert.

Die RNA aus DDR1(-/-)- bzw. (+/-)-Mäusen wurde in Anwesenheit von Cy3- (Kontrolle= (+/-)-Maus) oder Cy5- (Probe= (-/-)-Maus) dCTPs in cDNA umgeschrieben und anschließend gemeinsam auf einen mit cDNA bedruckten Microarray gegeben.

Parallel dazu wurde ein weiterer Microarray mit umgeschriebener cDNA aus der gleichen RNA hybridisiert, wobei aber die Cy3/Cy5-Markierung wechselseitig vertauscht wurde (sog. Cy-flip). Diese Maßnahme stellte eine weitere Kontrolle dar, die falsche Werte eliminiert, welche durch unterschiedliche Inkorporations-Effizienz der fluoreszenz-gekoppelten Nukleotide entstanden sein könnten. Es ist bekannt, dass Cy5-dCTP mit einer geringeren Effizienz in cDNA eingebaut wird als Cy3-dCTP. Prinzipiell wäre vorstellbar, dass die Effizienz des Einbaus auch in gewisser Weise von der umzuschreibenden Sequenz abhängt. In einem solchen Fall würde ein Gen, bei dessen reverser Transkription eines der beiden Nukleotide aufgrund der Sequenz des Gens besser oder schlechter eingebaut wird, stets als reprimiert bzw. induziert erscheinen. Daher wurde die Markierung wechselseitig vertauscht, so dass das Gen in einem Fall reprimiert, im anderen aber induziert erscheint, wodurch es sich als falsch positiv erkennen lässt.

4.2.1 Auswertung der Microarray-Daten

Mit Hilfe der Microarrays konnten etwa 85 Gene identifiziert werden, die in der Brustdrüse der DDR1-Knock-out-Maus dereguliert waren. Davon waren ca. 50 Gene in allen Experimenten mindestens 1,4fach in der DDR1(-/-)-Brustdrüse, verglichen mit der heterozygoten, induziert, während etwa 35 Gene in Brustdrüsen der DDR1(-/-)-Mäuse reprimiert waren. Nach Berechnung der Deregulation fand eine Bewertung der Gene statt. Dazu wurden zunächst von jedem Gen über die UniGene-Datenbank und verknüpfte Datenbanken wie LocusLink und HomoloGene Informationen gesammelt, um eine erste Einschätzung des Gens vornehmen zu können: Handelt es sich um ein bekanntes Gen? Wo wird es exprimiert? Kennt man eine Funktion? Ist es schon einmal mit der Brustdrüsenentwicklung in Zusammenhang gebracht worden? Welche Publikationen gibt es über dieses Gen? Anhand dieser vorläufigen Bewertung wurden solche Gene ausgesucht, die anschließend weiter analysiert wurden.

4.2.2 Microarray-Daten können mit der Real-time-PCR verifiziert werden

Aus der Liste der Gene, welche in allen Microarray-Experimenten eine Deregulation zeigten (Tabelle 3.5), wurden einige ausgewählt, um ihre Deregulation in einem Real-time-PCR-Experiment zu überprüfen. Die Auswahl der Gene, welche weiter analysiert wurden, erfolgte anhand der Höhe der Deregulation (mindestens 1,4fach) und der Häufigkeit ihres Auftretens bei allen Experimenten. Außerdem wurden solche Gene bevorzugt ausgewählt, die in der Literatur bereits mit der Brustdrüsenentwicklung in Verbindung gebracht worden sind.

Wie in Tabelle 3.5 zu sehen ist, konnte in der Real-time-PCR mit Ausnahme des Tuftelin interagierenden Proteins für jedes Gen die im Array ermittelte Deregulation bestätigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Methode der Real-time-PCR sich gut eignet, um Daten aus Array Experimenten zu verifizieren (Pandini *et al.*, 2003; Ramos-Nino *et al.*, 2003). Die aus der Real-time-PCR erhaltenen Daten zeigten dabei nicht immer den gleichen Wert der Deregulation, der mit Hilfe der Microarray-Analyse ermittelt wurde. Diese Beobachtung ist auch von anderen Gruppen gemacht worden und wurde darauf zurückgeführt, dass die zur Berechnung der x-fachen Deregulation verwendeten Algorithmen für beide Methoden unterschiedlich sind (Riesewijk *et al.*, 2003). Für die meisten untersuchten Gene konnte dennoch näherungsweise der gleiche Wert der Deregulation in der Real-time-PCR sowie im Microarray-Experiment beobachtet werden. Die mögliche Bedeutung dieser Gene in Bezug auf DDR1 und auf die Entwicklung der Brustdrüse werden im Folgenden diskutiert.

4.2.3 DDR1 regulierte Zielgene und ihre Bedeutung in der Brustdrüse

Mit den vorliegenden Daten wurde die DDR1 abhängige Deregulation von Genen identifiziert, die zuvor nicht mit der Expression von DDR1 in Verbindung gebracht worden sind. Neben diesen konnte aber auch die bekannte Deregulation des terminalen Differenzierungsmarkers WDNMI bestätigt werden (Vogel *et al.*, 2001).

4.2.3.1 MDGI (mammary derived growth inhibitor)

MDGI (mammary derived growth inhibitor, auch genannt FABP (fatty acid binding protein)) zeigte im Array sowie bei der Real-time-PCR eine 2,5-3fache Repression in der DDR1-Knock-out-Maus verglichen mit der heterozygoten Maus. MDGI ist ein zytoplasmatisches, hydrophobes Liganden-Bindeprotein, das mit der Differenzierung der Brustdrüse assoziiert wird (Wang *et al.*, 2000). Die Expression ist in der differenzierten, laktierenden Brustdrüse am höchsten (Kurtz *et al.*, 1990). Es zeigt also das gleiche Expressionsprofil wie DDR1 (Vogel *et al.*, 2001). Man kann daher anhand der vorliegenden Daten vermuten, dass DDR1 bei der Induktion von MDGI während der Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. Wird endogenes MDGI in Organkulturen der Brustdrüse inhibiert, so ist die Ausbildung alveolärer Strukturen, die ein Kennzeichen für terminale Differenzierung ist, gehemmt. Gleichzeitig ist die Expression von β -Kasein inhibiert (Kurtz *et al.*, 1998). Dieser Phänotyp kann auch in der DDR1-Knock-out-Maus beobachtet werden (siehe 3.5.2 und Vogel *et al.*, 2001).

Die Bedeutung von MDGI beim Mammakarzinom wird durch den Umstand deutlich, dass die Expression dieses Proteins während der Tumorprogression verloren geht (Huynh *et al.*, 1996). Es ist daher als Tumorsuppressor ein potenzielles Zielgen für die Therapie von Brustkrebs (Wang *et al.*, 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse mit MDGI werden durch die publizierten Daten bestätigt, die zeigen, dass ein Fehlen von DDR1 die Milchprotein-Expression negativ beeinflusst, also die terminale Differenzierung von Brustepithelzellen von der DDR1-Expression abhängig ist. Gleichzeitig scheint das Fehlen von DDR1 mit der zur Differenzierung essenziellen Expression von MDGI zusammenzuhängen. Es ist vorstellbar, dass DDR1 die Expression von MDGI über Transkriptionsfaktoren induziert, oder aber Proteine inhibiert, die ihrerseits die Expression von MDGI verhindern. In jedem Fall ist die Expression von MDGI in Abwesenheit von DDR1 reprimiert, was zu einer mangelhaft differenzierten Brustdrüse führt. Es wäre interessant zu sehen, ob in DDR1-Knock-out-Zellen durch die heterologe Überexpression von MDGI die Differenzierung der Brustdrüsenzellen verbessert werden kann. Dies würde dann bedeuten, dass die mangelnde Differenzierung der Brustdrüse in DDR1-Knock-out-Mäusen zumindest zum Teil auf die fehlende Induktion der MDGI-Expression zurückzuführen ist.

4.2.3.2 Osteopontin (OPN)

Auch die Transkription von OPN war in der Brustdrüse der DDR1(-/-)-Maus reprimiert. OPN ist ein sekretiertes, Integrin bindendes Glykoprotein, das man in der ECM von Knochen, Nieren aber auch der Brustdrüse und in einigen Brustepithelzelllinien findet (Rittling & Novick, 1997). Es ist schon mehrfach mit der Brustdrüse in Zusammenhang gebracht worden und als wichtiger Regulator der Brustdrüsen-Morphogenese bekannt (Brown *et al.*, 1992; Rittling & Novick, 1997). Die Expression von OPN ist in der Brustdrüse reguliert mit mäßiger Expression in der undifferenzierten Brustdrüse und während der Schwangerschaft. Die höchste Expression von OPN findet man am zweiten Tag der Laktation. Danach nimmt sie wieder ab, bleibt aber während der Involution noch recht hoch. In malignen Brustkarzinomen ist die Expression von OPN erhöht (Tuck & Chambers, 2001). Interessanterweise konnte in Mäusen, in denen die Expression von OPN spezifisch in der Brustdrüse reprimiert wurde, wie auch in der DDR1-Knock-out-Maus ein Verlust der Laktationsfähigkeit beobachtet werden (Nemir *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2001). Die OPN reprimierten Mäuse zeigen eine stark verringerte Alveolen-Bildung während der Schwangerschaft und eine drastische Reduktion der β -Kasein-Expression. Sie sind daher nicht in der Lage, ihre Jungen ausreichend mit Milch zu versorgen. 70 % des Wurfes stirbt innerhalb von 24 Stunden an Unterernährung, was dem Phänotyp der DDR1-Knock-out-Maus entspricht. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob DDR1 in der OPN-reprimierten-Maus hochreguliert ist. Dies könnte dann ein Hinweis darauf sein, dass DDR1 für die OPN-Expression während der Laktation essentiell ist und die erhöhte DDR1-Expression in der OPN-reprimierten-Maus eine Kompensation darstellt. Ebenso lässt sich annehmen, dass DDR1 an der Induktion von OPN während der Schwangerschaft und der Laktation beteiligt ist und daher in der DDR1(-/-)-Maus die OPN-Expression reprimiert ist.

4.2.3.3 Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5)

Ein Gen, das in der Brustdrüse schwangerer Knock-out Mäuse hochreguliert war, ist das IGFBP-5 (insulin like growth factor binding protein 5). IGFBP-5 gehört mit fünf weiteren Mitgliedern zu der hoch konservierten Familie der IGF-Bindeproteine (IGFBP1-6) (Jones & Clemmons, 1995). IGFBP-5 ist das am stärksten konservierte Mitglied der IGFBP-Familie. Es ist zwischen Mensch und Maus zu 97 % identisch.

Die räumliche sowie zeitliche Expression der IGFBPs ist streng reguliert (Schneider *et al.*, 2002). Eine starke Erhöhung der IGFBP-5-Expression ist während der Involution der Brustdrüse zu beobachten (Tonner *et al.*, 1997). Es wirkt hier aufgrund seiner Fähigkeit, die Interaktion von IGF mit dem IGF-Rezeptor zu verhindern, als Inhibitor der Zellproliferation und des Überlebens (Marshman *et al.*, 2003). Auch in der Zellkultur inhibiert IGFBP-5 das durch IGF vermittelte Überleben von epithelialen Brustdrüsenzellen. Mäuse, die IGFBP-5 in der Brustdrüse überexprimieren, zeigen eine erhöhte Apoptoserate der Brustdrüsenzellen, was zu einer Reduktion der Milchsynthese um bis zu 50 % führt (Tonner *et al.*, 2002). Man vermutet, dass Prolaktin, welches während der Laktation exprimiert wird, die Produktion von IGFBP-5 unterdrückt (Tonner *et al.*, 2002). IGFBP-5 kann die Aktivität von IGF aber auch positiv beeinflussen, indem es z. B. IGF zum Rezeptor rekrutiert (Jones & Clemmons, 1995). IGFBP-5 ist bislang eines der wenigen Gene, für das in der Brustdrüse schwangerer DDR1-Knock-out-Mäuse eine Erhöhung der Expression gezeigt werden konnte. Das Fehlen von DDR1 könnte die direkte Ursache für die erhöhte Expression von IGFBP-5 sein. Es ist aber auch vorstellbar, dass die Expression von IGFBP-5 über andere Signalwege angeschaltet wird, weil die Brustdrüse in ihrer funktionellen Differenzierung gehemmt ist.

4.2.3.4 Weitere Beobachtungen

Das „salivary protein“ war mit durchschnittlich 7,2facher Repression das am stärksten deregulierte Gen in der Brustdrüse schwangerer DDR1-Knock-out-Mäuse. Es ist nichts weiter über dieses Gen bekannt, als dass es in der Speicheldrüse exprimiert wird (Bekhor *et al.*, 1994). Ein Zusammenhang mit der Brustdrüse ist nicht bekannt, daher können keine Rückschlüsse auf die Beziehung zu DDR1 gezogen werden.

Ähnlich verhält es sich mit dem Nocturin, das 2,2fach induziert war. Seine Bedeutung für die Brustdrüse ist unbekannt. Es wird in einem strengen Tag-Nacht-Rhythmus exprimiert (Barbot *et al.*, 2002). Daher ist bei diesem Gen vorstellbar, dass es sich um ein falsch positives handelt. Je nachdem, wann die Mäuse zur Brustdrüsenentnahme getötet wurden, kann es hier zur Messung scheinbarer Deregulationen gekommen sein, die ursächlich nichts mit der Expression von DDR1 zu tun haben, sondern darin begründet sind, dass dieses Gen in einem Tag-Nacht-Rhythmus exprimiert wird.

4.2.3.5 Ausblick I

Da die Suche nach differenziell regulierten Genen in Brustdrüsen schwangerer Mäuse, also in der differenzierten Brustdrüse stattfand, ist die Analyse der hierbei gefundenen Gene in nicht-differenzierten Brustepithelzellen nicht möglich. Der Einfluss von DDR1 auf diese Gene ist erst dann zu beobachten, wenn die Expression dieser Gene sich im Zuge der Differenzierungsprozesse ändert.

Der Einfluss von DDR auf die Transkription der gefundenen Gene ist auch wesentlich von der Zelllinie bzw. dem Gewebe abhängig, in dem der Effekt untersucht wird. Die Deregulation der Gene, die in NIH3T3- (murine Fibroblasten) und HT1080- (humane Fibrosarkomzelllinie) Zellen gefunden wurde, konnte in den Experimenten mit dem Brustdrüsengewebe nicht beobachtet werden. Das könnte daran liegen, dass die Funktion von DDR1 je nach untersuchtem Gewebe oder Spezies unterschiedlich ist. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass in den humanen und den murinen Zellen unterschiedliche deregulierte Gene gefunden wurden. Es ist aber auch denkbar, dass deshalb unterschiedliche Gene gefunden wurden, weil im Fall der Zelllinien nach Zielgenen aus DDR1 und 2 überexprimierenden Zellen gesucht wurde, während bei den Experimenten mit dem Brustdrüsengewebe Knock-out-Tiere mit heterozygoten verglichen wurden. Beim Vergleich der Daten, muss die Abwesenheit von DDR1 nicht unbedingt den gegenteiligen Effekt haben wie die Überexpression. Diese Aspekte erschwerten die weitere Analyse.

Die mit Hilfe der Microarrays gefundenen Zielgene sollten anschließend mit einem geeigneten In-vitro-System weiter analysiert werden. Die im dritten Teil dieser Arbeit verwendete Brustepithelzelllinie HC11 lässt sich in-vitro differenzieren und diente daher dazu, die Daten aus den Microarray weiter zu analysieren.

4.3 In-vitro-Studien über die Bedeutung von DDR1 in Brustepithelzellen

Um die Rolle von DDR1 in der Entwicklung der Brustdrüse weiter zu untersuchen, wurde ein in-vitro System gesucht, das möglichst nah an der Situation im Organismus ist und sich dennoch leicht handhaben lässt. Die HC11-Zelllinie ist eine nicht-transformierte Brustepithelzelllinie, die sich durch Zugabe von laktogenen Hormonen differenzieren lässt, so dass sie sich morphologisch wie funktionell von nicht-differenzierten Zellen unterscheidet (Ball *et al.*, 1988). Sie ist aus einem isolierten Zellklon der COMMA-1D-Zelllinie (murine Brustepithelzelllinie aus schwangerer Balb/c-Maus) entstanden. Nach mehrtägigem Halten in konfluentem Zustand können HC11-Zellen durch Zugabe von Dexamethason, Insulin und Prolaktin (=DIP) differenzieren (Ball *et al.*, 1988). Sie exprimieren dann den Differenzierungsmarker β -Kasein, der sich leicht im Western Blot oder mit Hilfe der Real-time-PCR nachweisen und quantifizieren lässt. HC11-Zellen lassen sich im Gegensatz zu primären Brustepithelzellen, die in-vitro nur differenzieren, wenn sie sich in der richtigen Matrix befinden, auch in der 2D-Kultur differenzieren (Hennighausen, 1997; Streuli & Bissell, 1991). Sie sind somit ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Differenzierungsvorgängen in der Brustdrüse.

Neben den HC11-Zellen wurden im dritten Teil dieser Arbeit auch primäre Brustepithelzellen isoliert aus DDR1(-/-)- und (+/-)-Mäusen verwendet.

4.3.1 Charakterisierung und Transfektion von HC11-Zellen

Die Zelllinie HC11 wurde wie die primären Brustepithelzellen zunächst in Bezug auf DDR1-Expression getestet. Es wurde eine Immunpräzipitation mit Lysaten der Zelllinie durchgeführt. Dabei fand ein Antikörper Verwendung, der spezifisch das alternativ gespligte Exon 11 in DDR1 erkennt. Dieses Exon ist in der b- und c-Isoform vorhanden, nicht aber in DDR1a. Außerdem wurde Concanavalin zur Präzipitation verwendet. Dieses bindet unspezifisch alle glykosilierte Proteine. Die anschließende Western Blot Analyse mit einem DDR1-Antikörper, welcher die Isoformen a, b und c erkennt, zeigte, dass DDR1 mit Concanavalin, nicht aber mit dem spezifischen Antikörper gegen DDR1b und DDR1c aus HC11-Zellen präzipitiert werden konnte (Abbildung 3.8). Aus diesem Experiment muss daher der Schluss gezogen werden, dass die Isoformen DDR1b und DDR1c in HC11-Zellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden, wohl aber die Isoform DDR1a.

Um die Rolle von DDR1 in HC11-Zellen zu charakterisieren, wurde DDR1b mittels viraler Transduktion in HC11 überexprimiert. In den transduzierten und selektierten HC11DDR1-Zellen konnte mit einem DDR1-Antikörper wie auch mit einem Flag-Antikörper im Western Blot eine starke Expression von DDR1 (Abbildung 3.9) detektiert werden.

4.3.2 DDR1 beeinflusst die Adhäsion von HC11-Zellen auf Kollagen

Zur weiteren Charakterisierung der HC11DDR1-Zellen wurde zunächst ihre Fähigkeit zur Adhäsion untersucht. Dazu wurden die Zellen auf normalen Zellkulturschalen ausgesät und die Geschwindigkeit ihrer Adhäsion bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass HC11DDR1-Zellen auf unbehandelten Zellkulturschalen mit vergleichbaren Kinetiken adhärieren wie HC11-Wildtyp-Zellen (Grafik 3.4). Ebenso wurde die Adhäsion auf Kollagen beschichteten Zellkulturplatten bestimmt. In diesem Fall hafteten die DDR1 überexprimierenden Zellen wesentlich schneller an der Zellkulturschale fest (Grafik 3.5). Das bedeutet, die Bindung von Kollagen an die extrazelluläre Domäne von DDR1 hat einen beschleunigenden Effekt auf die Adhäsion von HC11-Zellen.

Die Interaktion von Epithelzellen mit der Matrix spielt in der Brustdrüse eine herausragende Rolle (Bissell, 1986). Verlieren die Zellen den Kontakt zur Matrix, so wird in den Zellen die Apoptose ausgelöst (Blatchford *et al.*, 1999). Die Interaktion wird dabei von Matrix-Rezeptoren wie Integrinen oder DDR1 vermittelt. In der Brustdrüse werden neben DDR1 weitere Kollagen-Rezeptoren, zum Beispiel die Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ und $\alpha_{11}\beta_1$ exprimiert (Klekotka *et al.*, 2001). Für Integrin $\alpha_2\beta_1$ konnte gezeigt werden, dass es für die Differenzierung der Brustdrüse unerlässlich ist (Zutter *et al.*, 1995). Diese Daten zeigen, dass in der Brustdrüse die Interaktion von Rezeptoren mit der ECM ausschlaggebend für die Differenzierung sowie das Überleben der Epithelzellen ist. Es ist gut vorstellbar, dass DDR1 durch seine beschleunigende Wirkung bei der Adhäsion an Kollagen die Differenzierung von Brustepithelzellen positiv beeinflussen kann. Diese These wird auch dadurch untermauert, dass die Differenzierung der Brustdrüse in DDR1(-/-)-Mäusen gestört ist.

Der Effekt von DDR1 auf die Adhäsion von Zellen konnte bereits in primären Mesangialzellen aus der Niere gezeigt werden, wo DDR1-Knock-out-Zellen langsamer auf Kollagen beschichteten Platten adhärten als DDR1 exprimierende Zellen (Curat & Vogel, 2002). Die verringerte Adhäsion von DDR1-Knock-out-Zellen könnte außerdem ein Hinweis darauf sein, dass DDR1 eine Rolle bei der Verhinderung der Metastasierung von Krebszellen spielen könnte.

4.3.3 Überexpression von DDR1 verhindert bei HC11-Zellen im 3D-Kollagen-Gel die morphologische Differenzierung

Eine wichtige Frage, welche in Experimenten mit HC11-Zellen sowie primären Brustepithelzellen beantwortet werden sollte, war die nach dem Einfluss von DDR1 auf die Differenzierung. Eine etablierte Methode, nicht-transformierte Brustepithelzellen in-vitro zu differenzieren, ist, sie mit einer dreidimensionalen Matrix zu umgeben und mit laktogenen Hormonen zu behandeln (Edwards *et al.*, 1998; Roskelley *et al.*, 1995). Die Analyse von biologischen Prozessen in der Zellkultur ist in hohem Maße vom Milieu abhängig, in dem sich die Zellen befinden. Durch die Verwendung einer dreidimensionalen Matrix kann man die In-vivo-Verhältnisse nachstellen. Die Auffassung, dass die Verwendung einer dreidimensionalen Matrix bei Experimenten in der Zellkultur von außerordentlicher Bedeutung ist, setzte sich in den letzten Jahren mehr und mehr durch (Abbott, 2003). Experimente in der 2D-Zellkultur lieferten nicht selten andere Ergebnisse, als solche, die in der 3D-Kultur durchgeführt wurden.

Als ECM wurde in dieser Arbeit aus Rattenschwänzen isoliertes Kollagen I verwendet. Dies hat im Gegensatz zu Matrigel™, das aus einem Gemisch von unterschiedlichen Matrixproteinen besteht (siehe 3.4.1), den Vorteil, dass es nur eine Komponente enthält. Außerdem ist durch Verwendung von Kollagen, dem natürlichen Liganden von DDR1, gewährleistet, dass sich der Rezeptor im aktivierten Zustand befindet.

Primäre DDR1(-/-)- und (+/-)-Brustepithelzellen wurden im 3D-Kollagen-Gel mit laktogenen Hormonen behandelt und die Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht. Weil in DDR1-Knock-out-Mäusen die Differenzierung des Brustepithels gestört ist (Vogel *et al.*, 2001), sollte überprüft werden, ob isolierte DDR1(-/-)-Brustepithelzellen im Kollagen-Gel eine morphologische Differenzierung zeigen.

Nach sieben bzw. fünf Tagen im Kollagen-Gel hatten die Zellen differenzierte Strukturen gebildet. Es konnte lichtmikroskopisch aber kein Unterschied zwischen DDR1(-/-)- und (+/-)-Zellen beobachten werden. Weder in der Anzahl der Verzweigungen noch in deren Länge oder Aussehen unterschieden sich die beiden Zellpopulationen voneinander. Die Abwesenheit von DDR1 führte also nicht zu einem Ausbleiben der morphologischen Differenzierung im 3D-Kollagen-Gel (siehe Abbildung 3.17).

In der DDR1-Knock-out-Maus findet das Auswachsen und die Verzweigung der Milchgänge während der Schwangerschaft statt. Erst gegen Ende der Schwangerschaft, wenn die Alveolen sich ausbilden und die funktionelle Differenzierung einsetzt, bleiben die Knock-out Mäuse in der Entwicklung zurück. Da das verzweigende Wachstum der Zellen im 3D-Kollagen-Gel lediglich eine morphologische Differenzierung darstellt, könnte dennoch die funktionelle Differenzierung der DDR1-Knock-out-Zellen verhindert sein. Diese These konnte mit der anschließenden Analyse der exprimierten Milchproteine auch bestätigt werden (siehe dazu 4.3.5).

Weiterhin wurde überprüft, ob im Gegensatz zu DDR1(-/-)-Zellen in DDR1 über-exprimierenden Zellen die morphologische Differenzierung beschleunigt oder vermehrt ist. Dazu wurde das gleiche Experiment mit HC11- und HC11DDR1-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich aber, dass HC11DDR1-Zellen im Gegensatz zur parentalen Zelllinie bei dieser Versuchsanordnung nicht nur keine morphologische Differenzierung zeigten, sondern gar nicht wuchsen (Abbildung 3.10).

Da HC11-Zellen im Kollagen-Gel sich nicht nur morphologisch veränderten, sondern offensichtlich auch proliferierten (vergleiche in Abbildung 3.10 A mit B), wurde der Einfluss von DDR1 auf das Zellwachstum im Kollagen-Gel gemessen. Die Auswertung ergab, dass die beide Zelllinien zunächst nur leicht proliferierten. Nach acht Tagen im Gel nahm allerdings die Zahl der HC11-Zellen stark zu. Demgegenüber änderte sich die Anzahl der HC11DDR1-Zellen im Kollagen-Gel nicht wesentlich. Dieses Ergebnis bestätigte die lichtmikroskopisch gemachte Beobachtung, dass HC11DDR1-Zellen nicht in der Lage sind, im 3D-Kollagen-Gel zu proliferieren.

Gleichzeitig bedeutet es aber, dass der morphologischen Differenzierung von HC11-Zellen im Kollagen-Gel eine Proliferation vorausgeht. In-vivo findet während der Schwangerschaft eine massive Proliferation der Milchgänge statt, die gegen Ende der Schwangerschaft die funktionellen Alveolen ausbilden (siehe 1.1 und Hovey *et al.*, 2002).

Dieser In-vitro-Test ist also mit dem ersten Teil der Schwangerschaft vergleichbar. Damit stimmen die Resultate aus den In-vitro-Experimenten mit den DDR1(-/-)-Zellen mit den Beobachtungen in der Brustdrüse der Knock-out-Maus überein.

4.3.4 Die Proliferation von HC11-Zellen wird durch DDR1 nicht beeinflusst

Nach den oben gezeigten Daten könnte DDR1 entweder Einfluss auf die Proliferation oder die Differenzierung von HC11-Zellen haben. Daher wurde zunächst in einem 2D-Proliferationstest untersucht, ob DDR1 generell einen Einfluss auf das Wachstum von HC11-Zellen hat. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Proliferationsrate der HC11DDR1-Zellen nicht von der der parentalen Zellen unterscheidet (Grafik 3.2). Dieses gilt auch dann, wenn sie auf Kollagen beschichteten Platten gemessen wird (Grafik 3.3). Das bedeutet, selbst wenn der Rezeptor ständig aktiv ist, wachsen HC11DDR1-Zellen mit gleicher Geschwindigkeit wie HC11-Zellen. Weder das Kollagen an sich noch DDR1 sind also direkt bzw. ausschließlich für das beobachtete Verhalten im Kollagentest verantwortlich. Es scheint vielmehr der dreidimensionale Kontext zu sein, in dem sich die Zellen befinden. Dies stimmt mit publizierten Daten überein, die der ECM für den Differenzierungsprozess einen entscheidenden Einfluss zusprechen. (Streuli, 1993). Daraus kann geschlossen werden, dass DDR1 in den Differenzierungsprozess eingreift. Vorstellbar wäre, dass DDR1 den Zustand der Enddifferenzierung begünstigt, d.h. die Zellen dazu bringt, terminal zu differenzieren, was gleichzeitig ein Beenden der Proliferation bedeuten würde. Dieser These wurde im Folgenden nachgegangen.

4.3.5 Die Expression des Differenzierungsmarkers β -Kasein ist in HC11DDR1-Zellen stark erhöht

Zur Beantwortung der Frage, welchen Einfluss DDR1 auf die funktionelle Differenzierung hat, wurden weitere Kriterien in Betracht gezogen, nämlich die Expression von terminalen Differenzierungsmarkern.

Primäre Brustepithelzellen wurden in ein 3D-Kollagen-Gel gegeben und mit laktogenen Hormonen behandelt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit Hilfe eines Anti-Milch-Antikörpers (Anti- β -Kasein stand zu dem Zeitpunkt nicht zur Verfügung) im Western Blot auf die Expression terminaler Differenzierungsmarker untersucht. Dabei konnte in der Spur der DDR1(+/-)-Zellen eine etwa 26 kDa große Bande detektiert werden, welche in der Spur der DDR(-/-)-Lysate fehlte.

Da dieser Western Blot mit einem Anti-Milch-Antikörper gemacht wurde, kann die Identität der Bande nicht mit vollständiger Sicherheit bestimmt werden, aber der Größe nach handelt es sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Milchprotein β -Kasein. Die aus der DDR1-Knock-out-Maus isolierten Brustepithelzellen formten also milchgangartige Strukturen im Gel, waren aber nicht in der Lage, β -Kasein zu exprimieren. Das bedeutet, sie durchliefen eine morphologische Differenzierung, hatten aber Defekte bei der Expression von Milchproteinen.

HC11-Zellen können im Gegensatz zu primären Brustepithelzellen auf unbehandelten Zellkulturschalen differenziert werden (Altiok & Groner, 1994; Happ & Groner, 1993; Wartmann *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 2002). Diese Differenzierung lässt sich durch die Expression von β -Kasein im Western Blot oder in der Real-time-PCR nachweisen, was zusätzlich auch eine exakte Quantifizierung erlaubt. HC11- und HC11DDR1-Zellen, welche durch Behandlung mit DIP auf unbehandelten Zellkulturschalen differenziert worden waren, wurden in einem Western Blot auf die Expression des Milchproteins β -Kasein hin analysiert (Abbildung 3.11). Hier zeigte sich, dass die Expression des Differenzierungsmarkers β -Kasein durch die Überexpression von DDR1 verstärkt bzw. beschleunigt wird, die Zellen also den gegenteiligen Phänotyp wie DDR1-Knock-out-Zellen zeigten. Die funktionelle Differenzierung von HC11-Zellen wurde also im Gegensatz zur morphologischen Differenzierung (siehe Abbildung 3.10) durch DDR1 nicht inhibiert, sondern verstärkt. Die genauere Quantifizierung der β -Kasein-Expression mit Hilfe der Real-time-PCR zeigte die unterschiedlichen Expressionsstärken. Die Induktion der β -Kasein-Transkription war in HC11DDR1-Zellen um ein Vielfaches höher (Δ Ct-Wert = 4,8) als in den HC11-Wildtyp-Zellen. Das Ergebnis untermauerte die Annahme, dass DDR1 die Differenzierung der HC11-Zellen stark beschleunigt. Das Ausbleiben differenzierter Strukturen von HC11DDR1-Zellen im 3D-Kollagen-Gel kann daher nicht als Anzeichen für fehlende Differenzierung gedeutet werden, sondern stellt vielmehr eine Folge der verstärkten bzw. beschleunigten Differenzierung dar.

Wie im Proliferationstest bereits gezeigt werden konnte (Grafik 3.1), ist die Ausbildung der milchgangartigen Strukturen im 3D-Kollagen-Gel von der Proliferation der Zellen abhängig. In dem zweidimensionalen System dagegen werden die Zellen zunächst in hoher Zelldichte gehalten, so dass die Proliferation zum Erliegen kommt. Erst danach wird die Differenzierung durch Zugabe von DIP induziert.

Nach der terminalen Differenzierung einer Zelle kommt aber die Proliferation zum Erliegen. Beschleunigt DDR1 den Differenzierungsvorgang, wird die Proliferation gehemmt und die Zellen können im Kollagen-Gel keine milchgang-ähnlichen Strukturen bilden, denn dafür ist eine Proliferation der Zellen nötig. Es ist daher vorstellbar, dass die hohe DDR1-Expression in den transduzierten Zellen dazu führt, dass in diesen Zellen der Schritt der morphologischen Differenzierung quasi übersprungen bzw. stark verkürzt wird, so dass die Zellen direkt zur funktionellen und damit terminalen Differenzierung übergehen.

In der DDR1-Knock-out-Maus ist die Proliferation und Differenzierung der Brustdrüse während der Schwangerschaft etwas verzögert. Doch der wesentliche Defekt wird erst gegen Ende der Schwangerschaft sichtbar. Die Differenzierung der Alveolen ist gehemmt, was zur Folge hat, dass die Anzahl und Größe der Alveolen zum Zeitpunkt der Geburt verringert ist (Vogel *et al.*, 2001). Die Beobachtungen in der Zellkultur, nämlich dass isolierte DDR1(-/-)-Brustepithelzellen im 3D-Kollagen-Gel zwar milchgangartige Strukturen ausbilden, aber im Gegensatz zu DDR1(+/-)-Zellen kein β -Kasein exprimieren, entsprechen also den Beobachtungen in-vivo.

4.3.6 Untersuchung der Signalkaskaden, die zur Expression von β -Kasein führen

Im Weiteren wurde untersucht, wie die Überexpression von DDR1 in den Signalweg der β -Kasein-Induktion eingreift.

In-vitro bedarf es der Zugabe von Glucocorticoiden (wie zum Beispiel Dexamethason), Insulin und Prolaktin, um eine Expression von β -Kasein zu erreichen (Hennighausen *et al.*, 1997). Diese Hormone schalten nachfolgende Signalkaskaden an und sorgen letztlich für die Transkription von Zielgenen wie dem β -Kasein. Der Einfluss von DDR1 auf diese Signalwege wurde im Folgenden einzeln untersucht.

4.3.6.1 DDR1 hat keinen Einfluss auf die Glucocorticoid-Signalkaskade

Zur Analyse des Glucocorticoid-Rezeptors, der durch Dexamethason aktiviert wird und nach Translokation in den Zellkern über die Bindung an GRE die Transkription initiieren kann, wurde ein Luciferase-Reporter-Test durchgeführt. Untersucht werden sollte, ob DDR1 die Interaktion von Dexamethason mit dem Glucocorticoid-Rezeptor oder die des Rezeptors mit dem GRE der DNA z. B. durch Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann.

Der Luciferase-Reporter-Test zeigte, dass die Transkription des Luciferin-Gens durch die Zugabe der laktogenen Hormone vierfach gesteigert werden konnte (Grafik 3.7). Das bedeutet, dass die Transfektion sowie die Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors mit dem verwendeten Protokoll erfolgreich war. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen den DDR1 exprimierenden HC11-Zellen und den parental Wildtyp-Zellen festgestellt werden. Somit interferiert DDR1 bei diesem Versuchsaufbau nicht mit dem Glucocorticoid-Signalweg.

Da die Rolle des Glucocorticoid-Rezeptors bei der DIP induzierten β -Kasein-Expression nicht abschließend geklärt ist, bleiben bei der Interpretation dieser Versuchsergebnisse einige Fragen offen. Stöcklin und Kollegen zeigten, dass der aktivierte Glucocorticoid-Rezeptor direkt mit phosphoryliertem Stat5 interagiert, den phosphorylierten Zustand stabilisiert und damit die Bindung des Stat5 an GAS-Elemente (z. B. im β -Kasein-Promotor) verlängert (Lechner *et al.*, 1997). Damit wäre der synergistische Effekt des Glucocorticoid-Rezeptors auf die Stat5 vermittelte Expression von Milchproteinen wie β -Kasein unabhängig von einem GRE (Stocklin *et al.*, 1996).

Andere Gruppen dagegen konnten zeigen, dass der Effekt abhängig von einem GRE ist, wenn auch die Sequenz des „Response-elements“ im Gegensatz zu den klassischen GREs nur aus einem halben Palindrom besteht (Lechner *et al.*, 1997; Wyszomierski *et al.*, 1999). Neuere Publikationen erklären diesen scheinbaren Widerspruch damit, dass die Wirkungsweise des Glucocorticoid-Rezeptors von der Stärke seiner Expression abhängt (Doppler *et al.*, 2001). Ist nur wenig aktiviertes Glucocorticoid-Rezeptor-Protein vorhanden, bindet es an das halbe GRE im Promotor von Zielgenen und induziert deren Transkription. Ist der Rezeptor dagegen in hohem Maße exprimiert, so kann es zusätzlich zur Bindung an GREs direkt mit Stat5 interagieren und die Bindung von Stat5 an das GAS-Element unterstützen. Unklar ist, welcher der beiden Effekte für die Vorgänge in Brustepithelzellen von größerer Bedeutung ist (Doppler *et al.*, 2001).

Mit dem oben geschilderten Versuch war es nur möglich, die durch GREs vermittelten Effekte von Glucocorticoid zu untersuchen, da mit dem Luciferase-Test die Transkriptionsinduktion von GREs in HC11- und HC11DDR1-miteinander verglichen wurde. Da aber der Glucocorticoid-Rezeptor auch mit Stat5 interagiert und dessen Phosphorylierung stabilisiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass DDR1 über die Verstärkung dieser Interaktion in die DIP induzierte Expression von β -Kasein eingreift.

Um diese Frage abschließend zu klären, müsste getestet werden, ob die endogene Expression von Glucocorticoid-Rezeptoren in HC11-Zellen so hoch ist, dass die beschriebene Interaktion von aktiviertem Glucocorticoid-Rezeptor mit Stat5 stattfindet. Nur wenn das nicht der Fall ist, kann eindeutig geschlossen werden, dass die erhöhte β -Kasein-Expression in DDR1 überexprimierenden HC11-Zellen nicht auf einen Einfluss von DDR1 auf den Glucocorticoid-Rezeptor zurückzuführen ist.

4.3.6.2 DDR1 hat keinen Einfluss auf die Insulin induzierte Signalkaskade

Zur optimalen β -Kasein-Expression in-vitro ist die Zugabe von Insulin zu den Brustepithelzellen notwendig (Hennighausen, 1997). Insulin bindet an den Insulin-Rezeptor, der dadurch aktiviert wird. Es kann auch an den IGF-Rezeptor binden, jedoch wesentlich schwächer als IGF I und II (Marshman & Streuli, 2002).

In-vivo sind die proliferationsstimulierenden Effekte von Insulin in der sich entwickelnden Brustdrüse unumstritten (Rosen *et al.*, 1999). Ebenso ist bekannt, dass Insulin in HC11-Zellen die Apoptose inhibieren kann (Merlo *et al.*, 1996). Die Stimulation von IGF-Rezeptor bzw. Insulin-Rezeptor überexprimierender Zellen mit Insulin führt zu einer raschen Phosphorylierung von IRS1 (Gual *et al.*, 1998). Auch Stat5 ist zumindest in-vitro ein direktes Substrat des Insulin-Rezeptors (Chen *et al.*, 1997). Ob dieser Signalweg allerdings auch in der Brustdrüse eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Insulin kann die Transkription zahlreicher Transkriptionsfaktoren aktivieren (MacDougald *et al.*, 1995). Zu diesen gehört auch der für die β -Kasein-Transkription wichtige Transkriptionsfaktor C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein β , siehe unten und Rosen *et al.*, 1999). Die genauen molekularen Mechanismen, durch welche Insulin mit Glucocorticoiden und Prolaktin kooperiert, um die Transkription von Milchproteinen zu induzieren, sind aber weitgehend unklar.

Um festzustellen, ob DDR1 einen Einfluss auf die Insulin vermittelte β -Kasein-Expression hat, wurde die Phosphorylierung von IRS1 untersucht. IRS1 ist ein Adaptorprotein, das sowohl vom IGF-Rezeptor als auch vom Insulin-Rezeptor phosphoryliert werden kann und danach als Gerüstprotein für die Bindung anderer Signalmoleküle mit SH2- oder PTB-Bindedomänen dient. Über diese Signalmoleküle kann es den MAP-Kinase- oder PI3-Kinase-Signalweg anschalten.

Da nicht bekannt ist, auf welchem Weg Insulin die Expression von β -Kasein unterstützt, wurde IRS1 zur Analyse der Insulin vermittelten Effekte ausgewählt. Es steht in der Signalkaskade relativ weit oben und ist ein Substrat des Insulin-Rezeptors sowie des IGF-Rezeptors.

Das IRS1-Protein wurde aus Zelllysaten von HC11-Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen, im „kompetenten“ sowie im differenzierten Zustand präzipitiert und im anschließenden Western Blot mit einem Phosphotyrosin spezifischen Antikörper detektiert. Wie erwartet, war IRS1 in Zellen, welche durch die Zugabe von DIP differenziert wurden, phosphoryliert, während es in den kompetenten Zellen sowie in Zellen, welche sich in normalem Wachstumsmedium befanden, nicht phosphoryliert war. Es konnte kein Unterschied in der IRS1-Phosphorylierung zwischen HC11DDR1- und HC11-Wildtyp-Zellen festgestellt werden. Die Expression von DDR1 hat also keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von IRS1.

4.3.6.3 DDR1 verstärkt die Prolaktin induzierte Phosphorylierung von Stat5a/b

Die dritte Komponente des Hormon-Mixes, das die Zellen zur Differenzierung erhielten, ist Prolaktin. Prolaktin bindet an den Prolaktin-Rezeptor und aktiviert über Jak2 den Transkriptionsfaktor Stat5a/b (siehe Kapitel 1.2). Daher wurde der Phosphorylierungsstatus von Stat5a/b in normalen, „kompetenten“ und differenzierten HC11- und HC11DDR1-Zellen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass DDR1 exprimierende HC11-Zellen nach drei Tagen Stimulation mit DIP eine um bis zu 50 % höhere Phosphorylierung von Stat5a/b aufwiesen (Abbildung 3.13 C). Die Signale von aktiviertem DDR1 verstärkten also die Prolaktin vermittelte Stat5a/b-Phosphorylierung, wobei ohne die Zugabe von DIP kein Effekt von DDR1 auf die Stat5a/b-Aktivierung zu sehen war (vergleiche Spuren 1-4 mit Spuren 5-6 in Abbildung 3.13).

Um diesen Effekt weiter zu analysieren, wurde die Phosphorylierung von Stat5a/b in einer Kinetik betrachtet. Phosphoryliertes Stat5a/b war bereits fünf Minuten nach Zugabe von DIP im Western Blot detektierbar, erreichte nach 10-20 Minuten ihren höchsten Wert und ließ nach 40 Minuten wieder langsam nach (Abbildung 3.14). In diesem Kinetik-Experiment konnte bestätigt werden, dass DDR1 exprimierende HC11-Zellen einen höheren Anteil an phosphoryliertem Stat5a/b haben als die Wildtyp-Zellen, wogegen die absolute Menge an Stat5a/b in den beiden Zelllinien gleich war und auch nicht durch die Aktivierung beeinflusst wurde (Abbildung 3.14 B).

Die Steigerung der Stat5a/b-Phosphorylierung durch Kollagen betrug in diesem Experiment bis zu 30 %, während nach einer dreitägigen Induktion der Unterschied bei 50 % lag (Abbildung 3.13). Diese Daten zeigen, dass tatsächlich eine Kreuzverbindung zwischen den Prolaktin aktivierten Signalwegen und dem Kollagen-DDR1-Signalweg besteht. Diese Beobachtung ist bisher noch nicht gemacht worden und könnte daher zu einer erweiterten Interpretation der bislang gültigen Lehrmeinung über laktogene Signalübertragung führen.

Vorangegangene Kinetik-Studien konnten zeigen, dass eine maximale Stat5a/b-Phosphorylierung nach Prolaktin-Stimulation in HC11-Zellen ihren Höchststand nach 15-30 Minuten erreicht, danach wieder abfällt und sich bei andauernder Stimulation auf ein niedrigeres Niveau einpendelt (Wartmann *et al.*, 1996). Eine bisher unbekannte Protein-Tyrosinphosphatase wurde für das Abklingen der Prolaktin induzierten Phosphorylierung von Stat5a/b verantwortlich gemacht. Die Behandlung von Brustepithelzellen mit dem Phosphatase-Inhibitor Vanadat verlängerte die Stat5a/b-Phosphorylierung auf mindestens zwei Stunden (Edwards *et al.*, 1998).

Möglicherweise liegen die hier beobachteten Effekte in der Inhibierung der postulierten Phosphatase begründet. Dagegen spricht aber, dass die Expression von DDR1 allein, d.h. ohne DIP, nicht zu einer detektierbaren Phosphorylierung von Stat5a/b führte (vergleiche Spuren 1-4 mit Spuren 5-6 in Abbildung 3.13). Erst nach Zugabe von DIP wurde in DDR1 exprimierenden Zellen eine stärkere Phosphorylierung von Stat5a/b sichtbar. Die Phosphorylierung von Proteinen in einer Zelle spiegelt die Verschiebung eines dynamischen Gleichgewichts wider. Hätte DDR1 einen direkten Einfluss auf die von Edwards *et al.* postulierte Phosphatase, so sollte die Überexpression von DDR1 auch ohne Induktion mit DIP eine Erhöhung der Stat5a/b-Phosphorylierung zur Folge haben, was aber nicht beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14). Die Ergebnisse sind daher so zu deuten, dass DDR1 synergistisch mit Prolaktin auf die Stat5a/b-Phosphorylierung wirkt.

4.3.6.4 Aktivierung von DDR1 verstärkt den Effekt von DDR1 auf die Stat5a/b-Phosphorylierung

In den vorangegangenen Experimenten konnte ein Einfluss von DDR1 auf die Prolaktin induzierte Phosphorylierung von Stat5a/b gezeigt werden. In einer weiteren Kinetik wurde untersucht, ob die Aktivierung von DDR1 durch Kollagen den Effekt der erhöhten Stat5a/b-Phosphorylierung weiter verstärkt (Abbildung 3.15). Die Zellen wurden dazu über Nacht mit Kollagen stimuliert, um die Aktivierung von DDR1 zu gewährleisten und am folgenden Tag mit DIP stimuliert. Der anschließende Western Blot zeigte, dass mit Kollagen stimulierte HC11DDR1-Zellen eine um bis zu 40 % stärkere Phosphorylierung aufwiesen als HC11DDR1-Zellen ohne Kollagen-Stimulierung (Abbildung 3.15 C). Verglichen mit den Kollagen stimulierten HC11-Wildtyp-Zellen, war die Stat5a/b-Phosphorylierung in HC11DDR1-Zellen sogar um 50 % gesteigert. Interessanterweise konnte auch in den HC11-Wildtyp-Zellen die DIP vermittelte Phosphorylierung durch Kollagen gesteigert werden (bis zu 30 %). Möglicherweise liegt dies an DDR1a, welches in geringen Mengen in den Wildtyp Zellen exprimiert wird. Der Effekt könnte aber auch über andere Kollagen-Rezeptoren wie z. B. Integrine vermittelt worden sein.

Die durch Kollagen verstärkte Phosphorylierung von Stat5a/b steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Edwards und Kollegen, die anhand ihrer mit primären Brustepithelzellen gewonnenen Daten davon ausgehen, dass Kollagen I eine inhibierende Wirkung auf die Stat5a/b-Phosphorylierung hat (Edwards *et al.*, 1998). In ihren Experimenten verwendeten sie primäre Brustepithelzellen, welche aus schwangeren Balb/c-Mäusen isoliert wurden. Diese Zellen exprimieren im Gegensatz zu HC11-Zellen nur dann Milchproteine, wenn sie auf bzw. in einer extrazellulären Matrix kultiviert werden. In ihren Experimenten gelang es ihnen nicht, eine Prolaktin induzierte Stat5a/b-Phosphorylierung oder eine Expression von Milchproteinen nachzuweisen, wenn die Zellen auf Kollagen-beschichteten Platten kultiviert wurden. Dagegen fanden sie Stat5a/b-Phosphorylierung wie auch Expression von β -Laktoglobulin in Zellen, wenn diese auf Matrigel wuchsen. Andere Gruppen dagegen fanden eine Expression von Milchproteinen in primären Brustepithelzellen, wenn diese sich auf oder in Kollagen-Gelen befanden (Emerman *et al.*, 1977; Jolivet *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1985). Außerdem verhalten sich HC11-Zellen insofern anders als die von Edwards verwendeten primären Zellen, als sie auch ohne eine exogen zugefügte ECM differenzieren und β -Kasein exprimieren (Ball *et al.*, 1988). Möglicherweise beruhen diese Unterschiede daher auf die Verwendung verschiedener Zellen bzw. Zellkultursysteme.

4.3.6.5 Der β -Kasein-Promotor wird durch verschiedene ECM-abhängige Transkriptionsfaktoren reguliert

Der β -Kasein-Promotor enthält außer der Bindestelle für Stat5a/b (GAS-Element) und einigen halb-palindromischen Glucocorticoid-Rezeptor-Bindestellen noch eine C/EBP β - (CCAAT/enhancer binding protein β) Erkennungssequenz (Rosen *et al.*, 1999). C/EBPs gehören zu der Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer aminoterminalen Transaktivierungsdomäne und einer C-terminalen basischen Leucin-Zipper-Domäne (bZIP), welche für die Dimerisierung und die Bindung an die DNA-Erkennungssequenz verantwortlich ist.

Von der C/EBP β -mRNA können durch Benutzung verschiedener Translationsstartpunkte drei unterschiedlich große Proteine synthetisiert werden. Die beiden größeren - sog. LAPs - („liver enriched activator proteins“ 39 und 36 kDa) haben aktivierende Eigenschaften auf die Transkription von Zielgenen, während das kleinere LIP („liver enriched inhibitory protein“, 20 kDa) inhibierend auf die Transkription wirkt und durch seine höhere Affinität zur Erkennungssequenz dominant negativ wirken kann (Descombes & Schibler, 1991).

In Brustepithelzellen aus C/EBP β -Knock-out Mäusen ist die Expression von β -Kasein um 85-100 % reduziert, was auf eine entscheidende Rolle dieser Transkriptionsfaktoren bei der Expression von β -Kasein hinweist. Wie bei dem Transkriptionsfaktor Stat5a/b konnte auch für diesen eine ECM regulierte Aktivität gezeigt werden (Cella *et al.*, 2000).

In primären Brustepithelzellen aus Kaninchen war die Menge an C/EBP β -Protein in Zellen, welche auf Kollagen I kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen auf Plastik stark erhöht (Jolivet *et al.*, 2001). Dagegen konnte eine Hemmung der C/EBP β -Expression in HC11-Zellen gezeigt werden, welche auf Tenascin plattiert wurden (Cella *et al.*, 2000). Die Regulation der C/EBP β vermittelten Transkription wird offensichtlich durch das Verhältnis von LAPs und LIP bestimmt (Descombes & Schibler, 1991).

Interessanterweise konnte ein kooperativer Effekt von Stat5a/b und C/EBP β bei der Transkription von β -Kasein gezeigt werden. Das heißt, die beiden Transkriptionsfaktoren waren in Kombination wesentlich effektiver bei der Transkription von β -Kasein als es von ihren Einzelleistungen her zu erwarten gewesen wäre. Dieser Synergismus war allerdings nur zu beobachten, wenn gleichzeitig ein transkriptionell aktiver Glucocorticoid-Rezeptor vorhanden war (Wyszomierski & Rosen, 2001).

Die Interaktion aller drei Transkriptionsfaktoren macht deutlich, dass diese Mechanismen nur schwer voneinander zu trennen sind und ihre Effekte nicht isoliert betrachtet werden können. Obwohl in dieser Arbeit der differenzierungsstimulierende Effekt von DDR1 auf eine erhöhte Stat5a/b-Phosphorylierung zurückgeführt werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass DDR1 auch einen Effekt auf den Transkriptionsfaktor C/EBP β hat.

4.3.6.6 Wie könnte DDR1 die Phosphorylierung von Stat5 beeinflussen?

Ein Einfluss von DDR1 auf die Stat5/b-Phosphorylierung konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden. Die Ergebnisse werfen die Frage auf, wie aktiviertes DDR1 die verstärkte, Prolaktin induzierte Phosphorylierung von Stat5a/b vermittelt. Etliche Möglichkeiten sind vorstellbar und müssen durch weitere Experimente überprüft werden.

Z. B. könnte die Überexpression von DDR1 die Expression von sekretierten Matrix-Proteinen verändern. HC11-Zellen sind in der Lage, ECM-Proteine zu sekretieren. Das „Kompetent“-Machen der HC11-Zellen, indem sie einige Zeit in konfluentem Zustand gehalten werden, hat unter anderem den Grund, dass die Zellen Gelegenheit haben, ECM-Proteine zu synthetisieren und zu sekretieren (Chammas *et al.*, 1994). Die ECM-Proteine ermöglichen es den laktogenen Hormonen dann erst, die Expression von β -Kasein zu vermitteln.

Es konnte beobachtet werden, dass HC11DDR1-Zellen in der Lage sind, auf Petri-Schalen, welche nicht für die Zellkultur geeignet sind, zu adhären, während sich Wildtyp-Zellen unter diesen Bedingungen nicht an den Boden der Petri-Schale anheften (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass HC11DDR1-Zellen eine erhöhte Produktion an Matrixproteinen aufweisen, welche es ihnen dann ermöglichen, zu adhären. Die durch DDR1 erhöhte Produktion von Matrix-Proteinen konnte auch in den Microarray-Experimenten mit DDR1 überexprimierenden HT1080- und NIH3T3-Zellen gezeigt werden. Da Matrix-Proteine benötigt werden, um die Effekte von DIP in HC11-Zellen zu vermitteln, ist vorstellbar, dass die erhöhte Matrixproduktion in HC11DDR1 die Zellen stärker für die Wirkung der laktogenen Hormone sensibilisiert und diese dadurch verstärkt wirken könnten.

In Abbildung 3.15 konnte gezeigt werden, dass die zur Aktivierung von DDR1 erfolgte Zugabe von Kollagen I zu einer weiteren Erhöhung der Stat5a/b-Aktivierung führt. Ist tatsächlich verstärkte Sekretion von Matrixproteinen für die erhöhte Stat5a/b-Phosphorylierung verantwortlich, ist nicht einleuchtend, wieso die Zugabe des ECM-Proteins Kollagen in einer sehr niedrigen Konzentration (10 µg/ml) eine weitere Erhöhung der Stat5a/b-Phosphorylierung zur Folge hat. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Matrixprotein-Expression für die Effekte verantwortlich ist. Dies muss in weiteren Experimenten überprüft werden, indem z. B. ein Matrixprotein wie Laminin, welches DDR1 nicht aktivieren kann, zu den Zellen gegeben wird, bevor die Prolaktin induzierte Stat5a/b-Phosphorylierung ermittelt wird.

Weiter ist vorstellbar, dass DDR1 die Expression des Prolaktin-Rezeptors erhöhen kann, was dann für die verstärkte Stat5a/b-Phosphorylierung verantwortlich sein könnte. Ebenso ist es möglich, dass DDR1 direkt oder indirekt über Jak2 mit Stat5a/b interagiert und dieses phosphoryliert. Dagegen spricht aber, dass eine Stat5a/b-Aktivierung nur in Anwesenheit von Prolaktin beobachtet werden konnte, eine Aktivierung der DDR1-Kinase also nicht ausreichend ist, um Stat5a/b zu phosphorylieren.

Wie in 4.3.6.3 geschildert, ist eine Phosphatase postuliert worden, die es zu hemmen gilt, um eine Stat5a/b-Phosphorylierung zu erreichen (Edwards *et al.*, 1998). Auch hier könnte DDR1 durch Hemmung der Phosphatase eingreifen. Ebenso ist vorstellbar, dass DDR1 in das komplizierte Wechselspiel von Stat5a/b, C/EBPβ und Glucocorticoid-Rezeptor eingreift, um die Expression von β-Kasein zu erhöhen.

4.3.7 Ausblick II

In der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, deren Transkription durch die Überexpression von DDR1 oder DDR2 bzw. durch die Abwesenheit von DDR1 beeinflusst werden. Die funktionelle Analyse dieser Gene wird weiter Aufschluss über die Rolle der DDRs und insbesondere ihre Bedeutung bei Tumorwachstum und Metastasierung, geben. Promotorstudien der gefundenen Zielgene könnten sich eignen, um die Signalwege von DDR1 und DDR2 zu erhellen. Über Konsensus-Sequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren in den Promotoren von Zielgenen sowie die Suche nach Protein-Interaktionspartnern dieser Transkriptionsfaktoren ließe sich so der Signalweg von den Rezeptoren bis hin zur Transkription von Zielgenen nachzeichnen.

Die Microarray-Analyse der Brustdrüsen aus DDR1-Knock-out-Mäusen erlaubte die Identifikation von Genen, deren Expression während der Schwangerschaft der DDR1-Knock-out-Mäuse dereguliert ist. Dadurch konnten erstmals Gene gefunden werden, die für die mangelnde Differenzierung der Brustdrüsen dieser Mäuse verantwortlich sind. Die Erhellung der Vorgänge während der Differenzierung der Brustdrüse stellt für die Krebsforschung einen wichtigen Aspekt dar. Die Zellen, die eine wiederholte Differenzierung der Brustdrüse erlauben, müssen Stammzellen-Charakter haben und werden daher als möglicher Ausgangspunkt für Brustkrebs diskutiert.

Ferner konnte DDR1 als essenzieller Faktor für die terminale Differenzierung in Brustepithelzellen festgestellt werden. Die Experimente im 3D-Kollagen-Gel sowie die Quantifizierung der Expression des terminalen Differenzierungsmarkers β -Kasein zeigten, dass DDR1 nicht zur Hormon induzierten Proliferation und zur morphologischen Differenzierung von Brustepithelzellen nötig ist, dagegen aber für die terminale, funktionelle Differenzierung, welche die Expression von Milchproteinen einschließt, essenziell ist.

Die Analyse der Signalkaskaden, die zur Expression von β -Kasein führen, erbrachte erstmals den Nachweis, dass der Kollagen-Rezeptor DDR1 einen synergistischen Effekt auf die Prolaktin induzierte Phosphorylierung von Stat5a/b hat. Wie dieser Effekt vermittelt wird und welche Faktoren dabei eine Rolle spielen, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

5 Literatur

- Abbott, A. (2003): Biology's new dimension. *Nature* **424** (21), 870-72
- Altioik, S., and Groner, B. (1994): beta-Casein mRNA sequesters a single-stranded nucleic acid-binding protein which negatively regulates the beta-casein gene promoter. *Mol Cell Biol* **14** (9), 6004-12.
- Alves, F., Saupe, S., Ledwon, M., Schaub, F., Hiddemann, W., and Vogel, W. F. (2001): Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines. *Faseb J* **15** (7), 1321-3.
- Alves, F., Vogel, W., Mossie, K., Millauer, B., Hofler, H., and Ullrich, A. (1995): Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* **10** (3), 609-18.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977): Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12), 5350-4.
- Andres, A. C., Schonenberger, C. A., Groner, B., Hennighausen, L., LeMeur, M., and Gerlinger, P. (1987): Ha-ras oncogene expression directed by a milk protein gene promoter: tissue specificity, hormonal regulation, and tumor induction in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (5), 1299-303.
- Baasner, S., von Melchner, H., Klenner, T., Hilgard, P., and Beckers, T. (1996): Reversible tumorigenesis in mice by conditional expression of the HER2/c-erbB2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **13** (5), 901-11.
- Ball, R. K., Friis, R. R., Schoenenberger, C. A., Doppler, W., and Groner, B. (1988): Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo J* **7** (7), 2089-95.
- Barbot, W., Wasowicz, M., Dupressoir, A., Versaux-Botteri, C., and Heidmann, T. (2002): A murine gene with circadian expression revealed by transposon insertion: self-sustained rhythmicity in the liver and the photoreceptors. *Biochim Biophys Acta* **1576** (1-2), 81-91.
- Barker, K. T., Martindale, J. E., Mitchell, P. J., Kamalati, T., Page, M. J., Phippard, D. J., Dale, T. C., Gusterson, B. A., and Crompton, M. R. (1995): Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene* **10** (3), 569-75.
- Bekhor, I., Wen, Y., Shi, S., Hsieh, C. H., Denny, P. A., and Denny, P. C. (1994): cDNA cloning, sequencing and in situ localization of a transcript specific to both sublingual demilune cells and parotid intercalated duct cells in mouse salivary glands. *Arch Oral Biol* **39** (12), 1011-22.
- Berens, C., and Hillen, W. (2003): Gene regulation by tetracyclines. *Eur J Biochem* **270** (15), 3109-21.
- Berk, A. J., and Sharp, P. A. (1977): Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* **12** (3), 721-32.

- Bezakova, G., and Ruegg, M. A. (2003): New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (4), 295-308.
- Bhatt, R. S., Tomoda, T., Fang, Y., and Hatten, M. E. (2000): Discoidin domain receptor 1 functions in axon extension of cerebellar granule neurons. *Genes Dev* **14** (17), 2216-28.
- Binns, K. L., Taylor, P. P., Sicheri, F., Pawson, T., and Holland, S. J. (2000): Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol* **20** (13), 4791-805.
- Bissell, M. J. (1986a) in *Growth and Differentiation of Mammary Epithelial Cells in Culture* (R.Ham, J. E. a., ed), Japan Scientific Society, Tokyo Japan
- Bissell, M. J. (1986b) in *Form and Function in the Mammary Gland*
- Blatchford, D. R., Quarrie, L. H., Tonner, E., McCarthy, C., Flint, D. J., and Wilde, C. J. (1999): Influence of microenvironment on mammary epithelial cell survival in primary culture. *J Cell Physiol* **181** (2), 304-11.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001): Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411** (6835), 355-65.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P. A. (1998): Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor Knockout mice. *Endocr Rev* **19** (3), 225-68.
- Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Farrington Rock, C., and Poulson, R. (2003): A novel and highly conserved collagen [proalpha 1 (XXVII)] with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem* **23**, 23
- Botchkarev, V. A. (2003): Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol* **120** (1), 36-47.
- Boutin, J. M., Jolicoeur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shirota, M., Banville, D., Dusanter-Fourt, I., Djiane, J., and Kelly, P. A. (1988): Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* **53** (1), 69-77.
- Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., Dvorak, H. F., and Senger, D. R. (1992): Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* **3** (10), 1169-80.
- Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25** (2), 169-93.
- Cella, N., Chiquet-Ehrismann, R., and Hynes, N. E. (2000): Lactogenic hormones and tenascin-C regulate C/EBPalpha and beta in mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* **76** (3), 394-403.
- Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. (1997): Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* **89** (17), 1260-70.
- Chammas, R., Taverna, D., Cella, N., Santos, C., and Hynes, N. E. (1994): Laminin and tenascin assembly and expression regulate HC11 mouse mammary cell differentiation. *J Cell Sci* **107** (Pt 4), 1031-40.

- Chen, J., Sadowski, H. B., Kohanski, R. A., and Wang, L. H. (1997): Stat5 is a physiological substrate of the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (6), 2295-300.
- Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzeler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G., Gabrielian, A. E., Landsman, D., Lockhart, D. J., and Davis, R. W. (1998): A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* **2** (1), 65-73.
- Clevenger, C. V., and Plank, T. L. (1997): Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2** (1), 59-68.
- Curat, C. A., and Vogel, W. F. (2002): Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **13** (11), 2648-56.
- Descombes, P., and Schibler, U. (1991): A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67** (3), 569-79.
- Doppler, W., Windeger, M., Soratroi, C., Tomasi, J., Lechner, J., Rusconi, S., Cato, A. C., Almlof, T., Liden, J., Okret, S., Gustafsson, J. A., Richard-Foy, H., Starr, D. B., Klocker, H., Edwards, D., and Geymayer, S. (2001): Expression level-dependent contribution of glucocorticoid receptor domains for functional interaction with STAT5. *Mol Cell Biol* **21** (9), 3266-79.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., and Trent, J. M. (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21** (1 Suppl), 10-4.
- Edwards, G. M., Wilford, F. H., Liu, X., Hennighausen, L., Djiane, J., and Streuli, C. H. (1998): Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **273** (16), 9495-500.
- Edwards, G. M., Wilford, F. H., and Streuli, C. H. (1996): Extracellular matrix controls the prolactin signalling pathway in mammary epithelial cells. *Biochem Soc Trans* **24** (3), 345S.
- Edwards, J. G., McLaren, J., Jones, J. L., Waller, D. A., and O'Byrne, K. J. (2003): Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer* **88** (10), 1553-9.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998): Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (25), 14863-8.
- Emerman, J. T., Enami, J., Pitelka, D. R., and Nandi, S. (1977): Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (10), 4466-70.
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. (2003): Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci* **23** (7), 2527-37.
- Ensslin, M. A., and Shur, B. D. (2003): Identification of Mouse Sperm SED1, a Bimotif EGF Repeat and Discoidin-Domain Protein Involved in Sperm-Egg Binding. *Cell* **114** (4), 405-17.

- Faraldo, M. M., Deugnier, M. A., Thiery, J. P., and Glukhova, M. A. (2000): Development of mammary gland requires normal beta 1-integrin function. *Adv Exp Med Biol* **480**, 169-74.
- Faraldo, M. M., Deugnier, M. A., Tlouzeau, S., Thiery, J. P., and Glukhova, M. A. (2002): Perturbation of beta1-integrin function in involuting mammary gland results in premature dedifferentiation of secretory epithelial cells. *Mol Biol Cell* **13** (10), 3521-31.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., and Nagy, G. (2000): Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* **80** (4), 1523-631.
- Fuentes-Prior, P., Fujikawa, K., and Pratt, K. P. (2002): New insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues lessons from high resolution crystal structures. *Curr Protein Pept Sci* **3** (3), 313-39.
- Gala, R. R. (1991): Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* **198** (1), 513-27.
- Gatmaitan, Z., Jefferson, D. M., Ruiz-Opazo, N., Biempica, L., Arias, I. M., Dudas, G., Leinwand, L. A., and Reid, L. M. (1983): Regulation of growth and differentiation of a rat hepatoma cell line by the synergistic interactions of hormones and collagenous substrata. *J Cell Biol* **97** (4), 1179-90.
- Geng, J. G., Raub, T. J., Baker, C. A., Sawada, G. A., Ma, L., and Elhammer, A. P. (1997): Expression of a P-selectin ligand in zona pellucida of porcine oocytes and P-selectin on acrosomal membrane of porcine sperm cells. Potential implications for their involvement in sperm-egg interactions. *J Cell Biol* **137** (3), 743-54.
- Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999): Integrin signaling. *Science* **285** (5430), 1028-32.
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., and Kelly, P. A. (2002): Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol* **64**, 47-67.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (12), 5547-51.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268** (5218), 1766-9.
- Gress, T. M., Hoheisel, J. D., Lennon, G. G., Zehetner, G., and Lehrach, H. (1992): Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* **3** (11), 609-19.
- Gual, P., Baron, V., Lequoy, V., and Van Obberghen, E. (1998): Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* **139** (3), 884-93.
- Hadsell, D. L., Bonnette, S. G., and Lee, A. V. (2002): Genetic manipulation of the IGF-I axis to regulate mammary gland development and function. *J Dairy Sci* **85** (2), 365-77.
- Happ, B., and Groner, B. (1993): The activated mammary gland specific nuclear factor (MGF) enhances in vitro transcription of the beta-casein gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* **47** (1-6), 21-30.

- Hennighausen, L. (1997): Molecular mechanisms of hormone controlled gene expression in the breast. *Mol Biol Rep* **24** (3), 169-74.
- Hennighausen, L., and Robinson, G. W. (1998): Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* **12** (4), 449-55.
- Hennighausen, L., Robinson, G. W., Wagner, K. U., and Liu, W. (1997): Prolactin signaling in mammary gland development. *J Biol Chem* **272** (12), 7567-9.
- Hou, G., Vogel, W., and Bendeck, M. P. (2001): The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest* **107** (6), 727-35.
- Hou, G., Vogel, W. F., and Bendeck, M. P. (2002): Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res* **90** (11), 1147-9.
- Hovey, R. C., Trott, J. F., and Vonderhaar, B. K. (2002): Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7** (1), 17-38.
- Howe, A., Aplin, A., Alahari, S., and RL., J. (1998): Integrin signalling and cell growth controll. *Curr Opin Cell Biol* **10** (2), 220-31
- Hu, Z. Z., Meng, J., and Dufau, M. L. (2001): Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J Biol Chem* **276** (44), 41086-94.
- Hunter, T. (2000): Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100** (1), 113-27.
- Huynh, H., Alpert, L., and Pollak, M. (1996): Silencing of the mammary-derived growth inhibitor (MDGI) gene in breast neoplasms is associated with epigenetic changes. *Cancer Res* **56** (21), 4865-70.
- Ikeda, K., Wang, L. H., Torres, R., Zhao, H., Olaso, E., Eng, F. J., Labrador, P., Klein, R., Lovett, D., Yancopoulos, G. D., Friedman, S. L., and Lin, H. C. (2002): Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. *J Biol Chem* **277** (21), 19206-12.
- Imagawa, W., Zang, J., Guzman R., Nandi, S. (2000) in *Methods in Mammary Gland Biology* (Ip, M. M., ed), pp. 111-123, Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York
- Jiang, G., and Hunter, T. (1999): Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol* **9** (15), R568-71.
- Johnson, J. D., Edman, J. C., and Rutter, W. J. (1993): A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (12), 5677-81.
- Jolivet, G., Meusnier, C., Chaumaz, G., and Houdebine, L. M. (2001): Extracellular matrix regulates alpha s1-casein gene expression in rabbit primary mammary cells and CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) binding activity. *J Cell Biochem* **82** (3), 371-86.
- Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16** (1), 3-34.
- Jonsson, M., and Andersson, T. (2001): Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells. *J Cell Sci* **114** (Pt 11), 2043-53.
- Kane, W. H., and Davie, E. W. (1988): Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* **71** (3), 539-55.

- Keely, P. J., Wu, J. E., and Santoro, S. A. (1995): The spatial and temporal expression of the alpha 2 beta 1 integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differentiation* **59** (1), 1-13.
- Kelly, P. A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C., and Edery, M. (1991): The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* **12** (3), 235-51.
- Kleimann, R. R., L. (1996): Testing the Agrin Hypothesis. *Cell* **85**, 461-464
- Klekotka, P. A., Santoro, S. A., Ho, A., Dowdy, S. F., and Zutter, M. M. (2001): Mammary epithelial cell-cycle progression via the alpha(2)beta(1) integrin: unique and synergistic roles of the alpha(2) cytoplasmic domain. *Am J Pathol* **159** (3), 983-92.
- Korach, K. S. (1994): Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* **266** (5190), 1524-7.
- Kurtz, A., Spitzer, E., Zschiesche, W., Wellstein, A., and Grosse, R. (1998): Local control of mammary gland differentiation: mammary-derived growth inhibitor and pleiotrophin. *Biochem Soc Symp* **63**, 51-69.
- Kurtz, A., Vogel, F., Funa, K., Heldin, C. H., and Grosse, R. (1990): Developmental regulation of mammary-derived growth inhibitor expression in bovine mammary tissue. *J Cell Biol* **110** (5), 1779-89.
- Labrador, J. P., Azcoitia, V., Tuckermann, J., Lin, C., Olaso, E., Manes, S., Bruckner, K., Goergen, J. L., Lemke, G., Yancopoulos, G., Angel, P., Martinez, C., and Klein, R. (2001): The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO Rep* **2** (5), 446-52.
- Lai, C., and Lemke, G. (1994): Structure and expression of the Tyro 10 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **9** (3), 877-83.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409** (6822), 860-921.
- Laszik, Z., Jansen, P. J., Cummings, R. D., Tedder, T. F., McEver, R. P., and Moore, K. L. (1996): P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* **88** (8), 3010-21.

- Laval, S., Butler, R., Shelling, A. N., Hanby, A. M., Poulsom, R., and Ganesan, T. S. (1994): Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Differ* **5** (11), 1173-83.
- Lechner, J., Welte, T., Tomasi, J. K., Bruno, P., Cairns, C., Gustafsson, J., and Doppler, W. (1997): Promoter-dependent synergy between glucocorticoid receptor and Stat5 in the activation of beta-casein gene transcription. *J Biol Chem* **272** (33), 20954-60.
- Lee, E. Y., Lee, W. H., Kaetzel, C. S., Parry, G., and Bissell, M. J. (1985): Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (5), 1419-23.
- Leitinger, B. (2003): Molecular Analysis of Collagen Binding by the Human Discoidin Domain Receptors, DDR1 and DDR2. IDENTIFICATION OF COLLAGEN BINDING SITES IN DDR2. *J Biol Chem* **278** (19), 16761-9.
- Lennon, G. G., and Lehrach, H. (1991): Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* **7** (10), 314-7.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K. U., Young, W. S., Hennighausen, L., and Furth, P. A. (1997): Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (7), 3425-30.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257** (5072), 967-71.
- Liotta, L. A. (1982): Tumor extracellular matrix. *Lab Invest* **47** (2), 112-3.
- Liu, X., Robinson, G. W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995): Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (19), 8831-5.
- Liu, X., Robinson, G. W., and Hennighausen, L. (1996): Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation. *Mol Endocrinol* **10** (12), 1496-506.
- Liu, X., Robinson, G. W., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997): Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* **11** (2), 179-86.
- Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A. (2000): Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405** (6788), 827-36.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology*, 3. Ed., WH Freeman and Company, New York
- Lund, L. R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M. J., Dano, K., and Werb, Z. (1996): Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* **122** (1), 181-93.
- MacDougald, O. A., Cornelius, P., Liu, R., and Lane, M. D. (1995): Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **270** (2), 647-54.
- Macgregor, P. F. (2003): Gene expression in cancer: the application of microarrays. *Expert Rev Mol Diagn* **3** (2), 185-200.

- Mantych, K. B., and Ferreira, A. (2001): Agrin differentially regulates the rates of axonal and dendritic elongation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **21** (17), 6802-9.
- Marshman, E., Green, K. A., Flint, D. J., White, A., Streuli, C. H., and Westwood, M. (2003): Insulin-like growth factor binding protein 5 and apoptosis in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* **116** (Pt 4), 675-82.
- Marshman, E., and Streuli, C. H. (2002): Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Res* **4** (6), 231-9.
- Massague, J., and Chen, Y. G. (2000): Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14** (6), 627-44.
- Matsuyama, W., Kamohara, H., Galligan, C., Faure, M., and Yoshimura, T. (2003): Interaction of discoidin domain receptor 1 isoform b (DDR1b) with collagen activates p38 mitogen-activated protein kinase and promotes differentiation of macrophages. *Faseb J* **17** (10), 1286-8.
- Medina, D. (1996): The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **1** (1), 5-19.
- Merlo, G. R., Graus-Porta, D., Cella, N., Marte, B. M., Taverna, D., and Hynes, N. E. (1996): Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects of receptor tyrosine kinase-activating peptide growth factors. *Eur J Cell Biol* **70** (2), 97-105.
- Mizuguchi, H., and Hayakawa, T. (2001): Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* **1568** (1), 21-9.
- Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., and Sameshima, T. (2002): Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* **52** (4), 255-64.
- Nemir, M., Bhattacharyya, D., Li, X., Singh, K., Mukherjee, A. B., and Mukherjee, B. B. (2000): Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J Biol Chem* **275** (2), 969-76.
- Nemoto, T., Ohashi, K., Akashi, T., Johnson, J. D., and Hirokawa, K. (1997): Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* **65** (4), 195-203.
- Neville, M. C., McFadden, T. B., and Forsyth, I. (2002): Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7** (1), 49-66.
- Newton, R. (2000): Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* **55** (7), 603-13.
- Olaso, E., Ikeda, K., Eng, F. J., Xu, L., Wang, L. H., Lin, H. C., and Friedman, S. L. (2001): DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* **108** (9), 1369-78.
- Olaso, E., Labrador, J. P., Wang, L., Ikeda, K., Eng, F. J., Klein, R., Lovett, D. H., Lin, H. C., and Friedman, S. L. (2002): Discoidin domain receptor 2 regulates fibroblast proliferation and migration through the extracellular matrix in association with transcriptional activation of matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem* **277** (5), 3606-13.

- Ongusaha, P. P., Kim, J. I., Fang, L., Wong, T. W., Yancopoulos, G. D., Aaronson, S. A., and Lee, S. W. (2003): p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. *Embo J* **22** (6), 1289-301.
- Ormandy, C. J., Binart, N., and Kelly, P. A. (1997a): Mammary gland development in prolactin receptor Knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2** (4), 355-64.
- Ormandy, C. J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., Edery, M., Brousse, N., Babinet, C., Binart, N., and Kelly, P. A. (1997b): Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* **11** (2), 167-78.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., and Schreiber, R. D. (2002): Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-31.
- Pandini, G., Medico, E., Conte, E., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2003): Differential gene expression induced by insulin and IGF-ii through the insulin receptor isoform A. *J Biol Chem* **24**, 24.
- Pawson, T. (1995): Protein modules and signalling networks. *Nature* **373** (6515), 573-80.
- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., and Fodor, S. P. (1994): Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (11), 5022-6.
- Pittius, C. W., Sankaran, L., Topper, Y. J., and Hennighausen, L. (1988): Comparison of the regulation of the whey acidic protein gene with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein gene promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* **2** (11), 1027-32.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000): Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275** (29), 21785-8.
- Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., and Brown, P. O. (1999): Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* **23** (1), 41-6.
- Prince, J. M., Klinowska, T. C., Marshman, E., Lowe, E. T., Mayer, U., Miner, J., Aberdam, D., Vestweber, D., Gusterson, B., and Streuli, C. H. (2002): Cell-matrix interactions during development and apoptosis of the mouse mammary gland in vivo. *Dev Dyn* **223** (4), 497-516.
- Pupa, S. M., Menard, S., Forti, S., and Tagliabue, E. (2002): New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol* **192** (3), 259-67.
- Ramos-Nino, M. E., Scapoli, L., Martinelli, M., Land, S., and Mossman, B. T. (2003): Microarray analysis and RNA silencing link fra-1 to cd44 and c-met expression in mesothelioma. *Cancer Res* **63** (13), 3539-45.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., and Gardner, M. B. (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33** (4), 1027-33.
- Riddle, O., Bates, R.W., and Dykshorn, S.W. (1933): The preparation, identification and assay of prolactin- a hormone of the anterior pituitary. *Am. J. Physiol.* **105**, 191-216

- Riesewijk, A., Martin, J., van Os, R., Horcajadas, J. A., Polman, J., Pellicer, A., Mosselman, S., and Simon, C. (2003): Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* **9** (5), 253-64.
- Rittling, S. R., and Novick, K. E. (1997): Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis. *Cell Growth Differ* **8** (10), 1061-9.
- Rosania, G. R., Chang, Y. T., Perez, O., Sutherlin, D., Dong, H., Lockhart, D. J., and Schultz, P. G. (2000): Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects. *Nat Biotechnol* **18** (3), 304-8.
- Rosen, J. M., Wyszomierski, S. L., and Hadsell, D. (1999): Regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Nutr* **19**, 407-36.
- Rosen, S. D., Kafka, J. A., Simpson, D. L., and Barondes, S. H. (1973): Developmentally regulated, carbohydrate-binding protein in Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70** (9), 2554-7.
- Roskelley, C. D., Srebrow, A., and Bissell, M. J. (1995): A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **7** (5), 736-47.
- Sakakura, T. (1987) in *The Mammary gland: development, regulation, and function* (Neville, M., and Daniel, C., eds), pp. 37-65, Plenum Press, New York and London
- Sakuma, S., Saya, H., Ijichi, A., and Tofilon, P. J. (1995): Radiation induction of the receptor tyrosine kinase gene Ptk-3 in normal rat astrocytes. *Radiat Res* **143** (1), 1-7.
- Sakuma, S., Saya, H., Tada, M., Nakao, M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Sawamura, Y., Shinohe, Y., and Abe, H. (1996): Receptor protein tyrosine kinase DDR is up-regulated by p53 protein. *FEBS Lett* **398** (2-3), 165-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition Ed. (Laboratory, C. S. H., Ed.), Cold Spring Harbour, New York
- Sanchez, M. P., Tapley, P., Saini, S. S., He, B., Pulido, D., and Barbacid, M. (1994): Multiple tyrosine protein kinases in rat hippocampal neurons: isolation of Ptk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (5), 1819-23.
- Sarmiere, P. D., and Bamburg, J. R. (2002): Head, neck, and spines: a role for LIMK-1 in the hippocampus. *Neuron* **35** (1), 3-5.
- Sauer, C. G., Gehrig, A., Warneke-Wittstock, R., Marquardt, A., Ewing, C. C., Gibson, A., Lorenz, B., Jurklies, B., and Weber, B. H. (1997): Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet* **17** (2), 164-70.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270** (5235), 467-70.
- Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9** (3), 383-91.
- Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R. K., and Groner, B. (1991): Beta-casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary-gland-specific nuclear factor. *Mol Cell Biol* **11** (7), 3745-55.

- Schneider, M. R., Wolf, E., Hoefflich, A., and Lahm, H. (2002): IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol* **172** (3), 423-40.
- Scholzen, T., Solursh, M., Suzuki, S., Reiter, R., Morgan, J. L., Buchberg, A. M., Siracusa, L. D., and Iozzo, R. V. (1994): The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation. *J Biol Chem* **269** (45), 28270-81.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., and Boyd, M. R. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* **48** (17), 4827-33.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T. E., Davis, S., Goldfarb, M. P., Glass, D. J., Lemke, G., and Yancopoulos, G. D. (1997): An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* **1** (1), 25-34.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998): Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92** (6), 735-45.
- Springer, W. R., Cooper, D. N., and Barondes, S. H. (1984): Discoidin I is implicated in cell-substratum attachment and ordered cell migration of Dictyostelium discoideum and resembles fibronectin. *Cell* **39** (3 Pt 2), 557-64.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996): Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383** (6602), 726-8.
- Streuli, C. H. (1993): Extracellular matrix and gene expression in mammary epithelium. *Semin Cell Biol* **4** (3), 203-12.
- Streuli, C. H., Bailey, N., and Bissell, M. J. (1991): Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* **115** (5), 1383-95.
- Streuli, C. H., and Bissell, M. J. (1991): Mammary epithelial cells, extracellular matrix, and gene expression. *Cancer Treat Res* **53**, 365-81.
- Streuli, C. H., Edwards, G. M., Delcommenne, M., Whitelaw, C. B., Burdon, T. G., Schindler, C., and Watson, C. J. (1995): Stat5 as a target for regulation by extracellular matrix. *J Biol Chem* **270** (37), 21639-44.
- Sun, H., Santoro, S. A., and Zutter, M. M. (1998): Downstream events in mammary gland morphogenesis mediated by reexpression of the alpha2beta1 integrin: the role of the alpha6 and beta4 integrin subunits. *Cancer Res* **58** (10), 2224-33.
- Susskind. (2003): Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy. *International Journal of Radiat oncology and Biological Physics* **15** (4), 1161-1169.
- Suzuki, T., Higgins, P. J., and Crawford, D. R. (2000): Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* **29** (2), 332-7.

- Talhok, R. S., Bissell, M. J., and Werb, Z. (1992): Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* **118** (5), 1271-82.
- Tonner, E., Barber, M. C., Allan, G. J., Beattie, J., Webster, J., Whitelaw, C. B., and Flint, D. J. (2002): Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) induces premature cell death in the mammary glands of transgenic mice. *Development* **129** (19), 4547-57.
- Tonner, E., Barber, M. C., Travers, M. T., Logan, A., and Flint, D. J. (1997): Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology* **138** (12), 5101-7.
- Topper, Y. J., and Freeman, C. S. (1980): Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* **60** (4), 1049-106.
- Tuck, A. B., and Chambers, A. F. (2001): The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6** (4), 419-29.
- Turner, C. E. (2000): Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* **2** (12), E231-6.
- van de Vijver, M. J., He, Y. D., van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A., Voskuil, D. W., Schreiber, G. J., Peterse, J. L., Roberts, C., Marton, M. J., Parrish, M., Atsma, D., Witteveen, A., Glas, A., Delahaye, L., van der Velde, T., Bartelink, H., Rodenhuis, S., Rutgers, E. T., Friend, S. H., and Bernards, R. (2002): A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* **347** (25), 1999-2009.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001): The sequence of the human genome. *Science* **291** (5507), 1304-51.
- Vogel, W., Brakebusch, C., Fassler, R., Alves, F., Ruggiero, F., and Pawson, T. (2000): Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* **275** (8), 5779-84.

- Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F., and Pawson, T. (1997): The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* **1** (1), 13-23.
- Vogel, W. F., Aszodi, A., Alves, F., and Pawson, T. (2001): Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development. *Mol Cell Biol* **21** (8), 2906-17.
- Wang, M., Liu, Y. E., Ni, J., Aygun, B., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2000): Induction of mammary differentiation by mammary-derived growth inhibitor-related gene that interacts with an omega-3 fatty acid on growth inhibition of breast cancer cells. *Cancer Res* **60** (22), 6482-7.
- Wartmann, M., Cella, N., Hofer, P., Groner, B., Liu, X., Hennighausen, L., and Hynes, N. E. (1996): Lactogenic hormone activation of Stat5 and transcription of the beta-casein gene in mammary epithelial cells is independent of p42 ERK2 mitogen-activated protein kinase activity. *J Biol Chem* **271** (50), 31863-8.
- Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M. J. (1997): Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* **137** (1), 231-45.
- Weiner, H. L., Huang, H., Zagzag, D., Boyce, H., Lichtenbaum, R., and Ziff, E. B. (2000): Consistent and selective expression of the discoidin domain receptor-1 tyrosine kinase in human brain tumors. *Neurosurgery* **47** (6), 1400-9.
- Weiner, H. L., Rothman, M., Miller, D. C., and Ziff, E. B. (1996): Pediatric brain tumors express multiple receptor tyrosine kinases including novel cell adhesion kinases. *Pediatr Neurosurg* **25** (2), 64-71; discussion 71-2.
- Werb, Z., Ashkenas, J., MacAuley, A., and Wiesen, J. F. (1996): Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res* **29** (9), 1087-97.
- Wiesen, J., and Werb, Z. (2000): Proteinases, cell cycle regulation, and apoptosis during mammary gland involution (minireview). *Mol Reprod Dev* **56** (4), 534-40.
- Witty, J. P., Wright, J. H., and Matrisian, L. M. (1995): Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Mol Biol Cell* **6** (10), 1287-303.
- Woodward, T. L., Mienaltowski, A. S., Modi, R. R., Bennett, J. M., and Haslam, S. Z. (2001): Fibronectin and the alpha(5)beta(1) integrin are under developmental and ovarian steroid regulation in the normal mouse mammary gland. *Endocrinology* **142** (7), 3214-22.
- Woodward, T. L., Xie, J., Fendrick, J. L., and Haslam, S. Z. (2000): Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins. *Endocrinology* **141** (10), 3578-86.
- Wyszomierski, S. L., and Rosen, J. M. (2001): Cooperative effects of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein-beta) on beta-casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **15** (2), 228-40.

- Wyszomierski, S. L., Yeh, J., and Rosen, J. M. (1999): Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* **13** (2), 330-43.
- Xie, J., LeBaron, M. J., Nevalainen, M. T., and Rui, H. (2002): Role of tyrosine kinase Jak2 in prolactin-induced differentiation and growth of mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **277** (16), 14020-30.
- Zerlin, M., Julius, M. A., and Goldfarb, M. (1993): NEP: a novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferating neuroepithelia. *Oncogene* **8** (10), 2731-9.
- Zhang, X., and Yee, D. (2000): Tyrosine kinase signalling in breast cancer: insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2** (3), 170-5.
- Zutter, M. M., Santoro, S. A., Staatz, W. D., and Tsung, Y. L. (1995): Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (16), 7411-5.

5.1 Eigene Veröffentlichungen

5.1.1 Poster

Elena Faraci, Maresa Eck, Bernhard Gertschmayer, Andreas Bosio and Wolfgang Vogel (2001): Employing microarray technology to identify downstream targets of DDRs, receptor tyrosine kinases involved in human cancer
STS-Meeting 2001: Signal transduction: Receptors, Mediators, and Genes; Weimar, Germany

Elena Faraci, Bernd Groner and Wolfgang Vogel (2003): Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) regulates branching morphogenesis of mammary gland cells in 3D collagen gels
12th International AEK Cancer Congress, Würzburg, Germany 2003

5.1.2 Publikationen

Faraci, E., Eck, M., Gertschmayer, B., Bosio, A. and Vogel, WF. (2003): An extracellular matrix-specific microarray allowed the identification of target genes downstream of Discoidin domain receptors. *Matrix Biol*, **22** (4), 373-81

Faraci, E. and Vogel, WF : DDR1 function is an essential prerequisite for Stat5-mediated lactogenesis. In Vorbereitung

6 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C/EBP β	CCAAT/enhancer binding protein β
CIP	Calf intestin Phosphatase
DDR	Discoidin-Domain-Rezeptor
DIP	Dexamethason, Insulin, Prolaktin
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
E 18	embryonaler Tag 18
ECM	extrazelluläre Matrix
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
FABP	Fatty acid binding protein
FCS(i)	fötales Kälberserum (inaktiviert)
GAS	γ -Interferon aktivierte Sequenz
Grb2	growth factor bound protein-2
GRE	Glucocorticoid response element
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HBSS	Hank's bufferd salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRP	horse raddish peroxidase
IGFBP-5	Insulin-like growth factor bindung protein-5
IGF(R)	Insulin like growth factor (receptor)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IRS1	Insulin Rezeptor Substrat 1

Jak2	Janus-kinase 2
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LAP	liver enriched activator protein
LIP	liver enriched inhibitory protein
LIMK	Lim domain kinase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MDGI	Mammary derived growth inhibitor
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOPS	Morpholinpropan-Sulfonesäure
mM	(milli)Molar
MusK	Muskel-spezifische Kinase
OPN	Osteopontin
OD _(260nm)	optische Dichte bei 260nm Wellenlänge
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAK	p21 aktivierte Kinase
PBS	phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI-3K	Phosphoinositol-3 kinase
PMS	N-methyldibenzopyrazine Methylsulfat
PRL(R)	Prolaktin (Rezeptor)
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho associated kinase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	Src homologe Domäne
SOS	Son of Sevenless
Stat	signal transducers and activators of transcription
TBS	Tris buffered saline
TEB	terminal end bud
U	Unit (Einheit)
WB	Western Blot

WT

Wildtyp

XTT

Sodium 3'-(1-(phenylaminocarbonyl)-3, 4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid

7 Anhang

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Groner für die Möglichkeit, diese Arbeit im Georg-Speyer-Haus anfertigen zu können. Ebenso danke ich Prof. Dr. Ludwig für die Übernahme der Betreuung von Seiten der Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Wolfgang Vogel für die Vergabe des Themas und seiner fachlichen sowie persönlichen Unterstützung dabei. Er hat mir in schwierigen Zeiten stets zur Seite gestanden und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Anregungen. Die wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm habe ich sehr geschätzt. Auch Vanita Jassal möchte ich an dieser Stelle für ihre Herzlichkeit und ihre Aufmunterungen danken.

Ebenso gilt mein Dank den Mitgliedern des 7334-Labors in Toronto, mit denen das Arbeiten wirklich großen Spaß gemacht hat (Rahim, when is the next "7334 Express" coming?!) Thank you, Catherine for organizing the lab so perfectly well, it was a pleasure to work in 7334.

Der Arbeitsgruppe Groner möchte ich dafür danken, dass sie mich nach meiner Zeit Toronto so herzlich aufgenommen hat.

Außerdem geht ein dickes Dankeschön an Maresa Eck und Bernhard Gerstmayer für die tolle Zusammenarbeit.

Corina Borghouts, Kerstin Nagel und Ilka Wittig danke ich für ihre kompetenten und unermüdlichen Korrekturen, die mir sehr geholfen haben.

Christiane Orf-Leisinger und Claudius Blume danke ich vielmals für die schnelle und sehr genaue Durchsicht dieser Arbeit.

Und ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Michael, der mir zu Liebe seine Abneigung gegen das Telefonieren überwand und sich jeden Tag ans Telefon setzte, damit ich mich ein wenig zu Hause fühlte. Sein Beistand hat mir über viele Durststrecken hinweggeholfen.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie stets an mich geglaubt und mir Mut gemacht haben, wenn es nicht so gut lief.

Lebenslauf

Name: Elena Faraci-Orf

Adresse: Gagernring 23, 65779 Kelkheim
Tel. 06195 961218
e-Mail: elenafaraci@gmx.de

geboren: 12.05.1972 in Offenbach am Main

Nationalität: italienisch

Familienstand: verheiratet

Schul Ausbildung

08/1978 – 07/1982 Waldschule (Grundschule) in Offenbach

08/1982 – 07/1984 Geschwister-Scholl- Schule (Förderstufe) in Offenbach

08/1984 – 06/1991 Albert-Schweitzer-Schule (Gymnasium) in Offenbach
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

09/1991 – 02/1994 Ausbildung zur Biologielaborantin bei der ASTA Medica AG in Frankfurt Main

Berufstätigkeit

02/1994 – 10/1994 beschäftigt als Biologielaborantin bei der ASTA Medica AG in der Abteilung molekulare Onkologie

Hochschulausbildung

10/1994 – 10/1996 Grundstudium der Biologie an der J.W.- Goethe Universität Frankfurt

10/1996 Vordiplom der Biologie

10/1996 – 03/1999 Hauptstudium mit dem Hauptfach Biochemie und den Nebenfächern Humangenetik und Mikrobiologie

03/1999 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Humangenetik und Mikrobiologie

05/1999 – 02/2000	Diplomarbeit, Titel: "Heterologe Expression und Charakterisierung von Matrilin-2",
04/2000 – 12/2001	Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus unter Betreuung von Dr. W. Vogel
01/2002 – 12/2002	Weiterführung der Doktorarbeit an der University of Toronto, Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Arbeitsgruppe Dr. W. Vogel
01/2003 – 10/2003	Fertigstellung der Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus; Titel: „Untersuchungen zur Genexpression durch Discoidin-Domain-Rezeptoren und zu deren Bedeutung in der Brustdrüsenentwicklung“

berufsbezogene/studienbegleitende Tätigkeiten

04/1995 – 02/1999	Nebentätigkeit im Institut für Pathologie, Städtische Kliniken in Offenbach
06/1998 – 07/1998	Praktikum am DKFZ

Stipendien

10/1996 – 02/2000	Stipendiat der „Studienstiftung des deutschen Volkes“
--------------------------	---

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, den 15 September 2003

Elena Faraci-Orf